

Untersuchungen zur Funktion sauerstofftoleranter, NAD⁺-reduzierender Hydrogenasen und zu deren Anwendung in der lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion in Cyanobakterien

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie
eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Ing. Biotech. Katja Karstens

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Bärbel Friedrich
2. Prof. Dr. Matthias Rögner
3. Prof. Dr. Peter Hildebrandt

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2014

Diese Arbeit wurde unter Leitung von Professor Dr. Bärbel Friedrich und Dr. Oliver Lenz in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Gefördert wurde die Studie aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Rahmen des Projekts „H₂-Designcells“ sowie durch ein Stipendium der Frauenförderung des Instituts für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit werden publiziert:

Karstens, K.; Wahlefeld, S.; Horch, M.; Grunzel, M.; Lauterbach, L.; Lendzian, F. Zebger, I.; Lenz, O. (Manuskript) Impact of the iron-sulfur cluster proximal to the active site on the catalytic function of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase.

Aus früheren Arbeiten ging folgende Publikation hervor:

Karstens, K.; Zschiedrich C. P.; Bowien, B.; Stülke, J.; Görke, B. (2014) Phosphotransferase protein EIIA^{Ntr} interacts with SpoT, a key enzyme of the stringent response, in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*. 160(4):711-22.

Zusammenfassung

Die lösliche, NAD^+ -reduzierende Hydrogenase (SH) aus *Ralstonia eutropha* H16 gehört zu den Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen. In dieser Gruppe der Hydrogenasen ist der Umsatz von H_2 im Hydrogenasemodul des Enzymkomplexes mit der Reduktion von NAD(P)^+ im NAD(P)H :Akzeptor-Oxidoreduktasemodul gekoppelt. Die SH aus *R. eutropha* ist Vertreter eines Subtyps, der auch in Gegenwart von Sauerstoff (O_2) katalytisch aktiv ist. Aktuelle Arbeiten zeigen, dass eine reduktive Entfernung von O_2 die Grundlage dieser Sauerstofftoleranz ist. Ein hierzu entwickeltes Modell geht davon aus, dass durch rückläufigen Elektronentransport vom NADH :Akzeptor-Oxidoreduktasemodul zum aktiven $[\text{NiFe}]$ -Zentrum in der großen Untereinheit des Hydrogenasemoduls eine Reduktion von O_2 zu harmlosem Wasser ermöglicht wird. Inwieweit dieser Elektronentransport durch den Eisenschwefel-(FeS)-Cluster in der kleinen Hydrogenaseuntereinheit HoxY beeinflusst ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die vier hochkonservierten Cysteinreste C41, C44, C113 und C179 an der Koordination des FeS-Zentrums in HoxY beteiligt sind. Außerdem wurde ein in räumlicher Nähe zum FeS-Cluster liegendes, zusätzliches Cystein als relevant für die Sauerstofftoleranz des SH-Komplexes identifiziert. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein zwischen dem HoxY-Cluster und dem aktiven $[\text{NiFe}]$ -Zentrum gelegener Tryptophanrest aus HoxY essentiell für die Hydrogenaseaktivität der SH ist. Diese Daten bestätigen ein Modell, in dem die Kinetik des rückläufigen Elektronentransports zum aktiven $[\text{NiFe}]$ -Zentrum maßgeblich durch die Aminosäureumgebung des FeS-Clusters in HoxY beeinflusst wird.

Ferner wurden in dieser Arbeit Ansätze zum Einsatz der SH aus *R. eutropha* in einer H_2 -produzierenden cyanobakteriellen Designzelle weiterverfolgt. Dazu wurden Hybridsysteme aus SH und cyanobakteriellem Photosystem I *in vitro* hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur lichtgetriebenen H_2 -Produktion untersucht. Außerdem wurde an einem heterologen Expressionssystem der SH für Cyanobakterien gearbeitet. Zum jetzigen Stand dieser Arbeiten steht jedoch in Frage, ob die SH aus *R. eutropha* als effizienter H_2 -produzierender Katalysator in einer cyanobakteriellen Designzelle verwendet werden kann.

Die SH aus *Rhodococcus opacus* MR11 wurde in der vorliegenden Arbeit als komplementäres Modellsystem für O_2 -tolerante Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen etabliert. Dieser zur SH aus *R. eutropha* homologe Komplex hatte in früheren Arbeiten Vorteile für spektroskopische und mechanistische Studien offenbart und wurde hier erstmals im direkten Vergleich zur SH aus *R. eutropha* biochemisch und spektroskopisch charakterisiert.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
1.1 Hydrogenasen	1
1.1.1 [NiFe]-Hydrogenasen	2
1.1.2 Pyridinnukleotid-abhängige [NiFe]-Hydrogenasen	4
1.1.3 Die lösliche, NAD ⁺ -reduzierende Hydrogenase (SH) aus <i>R. eutropha</i>	6
1.1.4 Die lösliche, NAD ⁺ -reduzierende Hydrogenase aus <i>R. opacus</i> MR11	7
1.2 Die cyanobakterielle Designzelle	8
1.2.1 Hydrogenase-PSI-Hybridkomplexe	11
1.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung dieser Arbeit	13
MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Plasmide und Bakterienstämme	16
2.2 Medien und Anzuchtbedingungen	23
2.2.1 Nährmedien und Antibiotika	23
2.2.2 Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	26
2.2.3 Anzucht von <i>R. eutropha</i> -Kulturen	26
2.2.4 Anzucht cyanobakterieller Kulturen	27
2.3 Allgemeine Techniken zum Arbeiten mit DNA	27
2.3.1 Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop [®]	27
2.3.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gel-Elektrophorese	28
2.3.3 Enzymatische Modifikation von DNA-Fragmenten	28
2.3.4 Polymerasekettenreaktion	28
2.3.5 QuickChange Mutagenese	29
2.3.6 Transformation von Plasmiden in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.3.7 Plasmidisolation	31
2.3.8 Isolation genomischer DNA	31
2.3.9 Konjugativer Plasmidtransfer in <i>R. eutropha</i> H16	32
2.3.10 Erzeugung modifizierter <i>R. eutropha</i> -Stämme durch doppelt homologe Rekombination	32
2.3.11 Plasmidtransfer in Cyanobakterien	33
2.3.12 Erzeugung modifizierter <i>Synechocystis</i> -Stämme durch homologe Rekombination	34
2.4 Strategien zur Herstellung von Stämmen für diese Arbeit	34
2.4.1 Heterologe Expression der SH aus <i>R. eutropha</i> in Cyanobakterien	35
2.4.2 Das Cytochrom <i>c₆</i> -Expressionssystem	38
2.4.3 Megaplasmid-basierte <i>hoxY</i> -Mutanten	38

2.4.4	Expressionsystem für eine <i>Strep</i> -Tag-tragende Version der SH aus <i>R. opacus</i>	39
2.5	Expression und Reinigung von Proteinen und Proteinkomplexen	40
2.5.1	Reinigung von Cytochrom <i>c</i> ₆ aus <i>E. coli</i>	40
2.5.2	Reinigung von PSI-Derivaten aus <i>Synechocystis</i>	41
2.5.3	Reinigung von SH-Derivaten aus <i>R. eutropha</i>	42
2.5.4	Reinigung der SH von <i>R. opacus</i> aus <i>R. eutropha</i>	43
2.5.5	Dissoziation des SH _{R₀MR11} -Komplexes mittels Anionenaustausch-Chromatographie	44
2.6	Allgemeine Techniken zum Arbeiten mit Proteinen	44
2.6.1	Quantitative Proteinbestimmung	44
2.6.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	45
2.6.3	Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel	45
2.6.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)	45
2.6.5	Fluoreszenzmessungen in ganzen Zellen	46
2.6.6	UV-vis-Absorptionsspektroskopie	47
2.6.7	FMN-Gehaltsbestimmung	47
2.7	Biochemische Charakterisierungen	48
2.7.1	Biochemische Charakterisierung der PSI-Derivate	48
2.7.1.1	Lichtgetriebene O ₂ -Reduktionsmessungen mit der Clark-Elektrode	48
2.7.2	Biochemische Charakterisierung der SH-Varianten	48
2.7.2.1	H ₂ -abhängige NAD ⁺ -Reduktion	48
2.7.2.2	NADH-abhängige BV-Reduktion	49
2.7.2.3	H ₂ -abhängige BV-Reduktion	49
2.7.2.4	MV-abhängige H ₂ -Produktion	49
2.7.2.5	H ₂ /D ⁺ -Austausch	51
2.7.3	Biochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe	52
2.7.3.1	Versuchsdurchführung zum Nachweis lichtgetriebener H ₂ -Produktion an der HU Berlin	52
2.7.3.2	Versuchsdurchführung zum Nachweis lichtgetriebener H ₂ -Produktion an der Universität Bochum	52
2.8	Elektrochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe	52
2.8.1	Kombinierte SEIRAS und elektrochemische Messungen	52
2.8.2	Messungen an mit Osmium-Polymeren funktionalisierten Elektroden	53
2.9	Charakterisierung der SH mit spektroskopischen Verfahren	54
2.9.1	Vorbereitung der reduzierten SH-Proben	54
2.9.2	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> (EPR)-Spektroskopie	54
2.9.3	Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Schwingungsspektroskopie	55

2.10 Geräte und Chemikalien	55
2.11 Verwendete Software und Datenbanken	56
ERGEBNISSE	57
3.1 Ansätze zur heterologen Expression des „SH-Operons“ aus <i>R. eutropha</i> in Cyanobakterien.....	57
3.1.1 Strategie zur genomischen Integration des „SH-Operons“ im <i>sll1514/slr1597</i> -Locus von <i>Synechocystis</i>	57
3.1.2 Neue Strategien basierend auf flexibel einsetzbaren genetischen Bausteinen.....	59
3.1.2.1 Konstruktion der genetischen Bausteine	59
3.1.2.2 Strategie zur plasmidbasierten Expression in verschiedenen cyanobakteriellen Spezies	61
3.1.2.3 Strategie zur Integration der SH-Gene in den <i>nrsBAC</i> -Locus von <i>Synechocystis</i>	65
3.1.2.4 Erstellung einer Δ <i>hoxEFU3Y67H::Spec^R-sacB</i> Deletionsmutante in <i>Synechocystis</i>	67
3.2 Untersuchungen zur Funktionalität von SH-PSI-Hybridkomplexen	69
3.2.1 Reinigung der Einzelkomponenten	69
3.2.1.1 Reinigung von PSI-Derivaten aus <i>Synechocystis</i>	69
3.2.1.2 Reinigung von SH-Derivaten aus <i>R. eutropha</i>	70
3.2.2 Biochemische Charakterisierung in <i>In-vitro</i> -Experimenten	71
3.2.2.1 Heterologe Produktion von Cytochrom <i>c₆</i> aus <i>Synechocystis</i> in <i>E. coli</i>	71
3.2.2.2 Einsatz von Cytochrom <i>c₆</i> als Elektronendonator für PSI-Derivate.....	73
3.2.2.3 Optimierung des Puffersystems hinsichtlich der maximalen Aktivitäten der Einzelkomponenten	74
3.2.2.4 Analyse der SH-PSI-Hybridkomplexe hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur H ₂ -Produktion in Lösung	77
3.2.3 Elektrochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe.....	79
3.2.3.1 Untersuchungen an einer funktionalisierten Au-Elektrode in Kombination mit SEIRA-Spektroskopie	79
3.2.3.2 Untersuchungen von SH-PSI-Hybridkomplexen an mit Osmium-Polymeren beschichteten Elektroden	82
3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Aminosäureumgebung des Eisenschwefelclusters in HoxY auf die Sauerstofftoleranz der SH aus <i>R. eutropha</i> H16.....	85
3.3.1 Vorbereitende Arbeiten für die Mutantenstudie an der SH	85
3.3.1.1 Etablierung des <i>strep-hoxF</i> -Allels auf dem Megaplasmid eines nur die SH-produzierenden <i>R. eutropha</i> -Derivats	85
3.3.1.2 Biochemische Eigenschaften der nativen SH aus <i>R. eutropha</i>	86
3.3.1.3 Verlust der HoxY-Untereinheit durch Austausch eines kompletten Motivs..	89

3.3.2 Charakterisierung von SH-Derivaten mit Austausch einzelner Aminosäuren in HoxY	91
3.3.2.1 Auswahl interessanter Aminosäureaustausche basierend auf einem multiplen Sequenzvergleich	91
3.3.2.2 Einfluss der Aminosäureaustausche in HoxY auf das lithoautotrophe Wachstum der Mutantenstämme und die H ₂ -Oxidationsaktivität der Zellextrakte	94
3.3.2.3 Biochemische Charakterisierung der gereinigten SH-Varianten	98
3.3.2.4 Der SH ^{C41S} -Komplex zeigt eine verlangsamte Reaktivierungskinetik	101
3.3.2.5 Aminosäureaustausche an der Position C39 führen zu erhöhter Sauerstoffempfindlichkeit der SH	102
3.3.2.6 Spektroskopische Charakterisierung ausgewählter SH-Varianten mittels UV-vis-Absorptions- und EPR-Spektroskopie	104
3.3.2.7 FTIR-Untersuchungen an den aktiven [NiFe]-Zentren der ausgewählten SH-Varianten	107
3.3.2.8 Der SH ^{W42S} -Komplex zeigt kaum H ₂ /D ⁺ -Austausch-Aktivität	109
3.4 Etablierung eines komplementären Modellsystems für lösliche, O₂-tolerante Hydrogenasen	111
3.4.1 Heterologe Produktion einer <i>Strep</i> -Tag II- tragenden Version der SH aus <i>R. opacus</i> MR11 in <i>R. eutropha</i>	111
3.4.2 Die <i>R. opacus</i> SH befähigt <i>R. eutropha</i> zur H ₂ -vermittelten NAD ⁺ -Reduktion ...	112
3.4.2.1 Reinigung der heterolog produzierten SH _{RoMR11} über <i>Strep</i> -Tactin-Affinitätschromatographie	113
3.4.2.2 Präparation der solitären HoxFU- und HoxHY-Heterodimere der SH aus <i>R. opacus</i>	115
3.4.3 Vergleichende Untersuchung der löslichen Hydrogenasen aus <i>R. eutropha</i> und <i>R. opacus</i>	119
3.4.3.1 Vergleich der biochemischen Charakteristika	119
3.4.3.2 Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften	121
3.4.3.3 Elektrochemische Charakterisierung der SH aus <i>R. opacus</i>	125
3.4.4 Auftrennung der SH aus <i>R. opacus</i> in ihre Module mittels Anion-Austauschchromatographie	127
DISKUSSION	130
4.1 Die heterologe Synthese des komplexen SH-Proteins in Cyanobakterien	130
4.1.1 Herausforderungen der heterologen Synthese komplexer Proteine – ein Modell.	131
4.1.1.1 Die heterologe Produktion von in Operon-codierten Multiproteinkomplexen	132
4.1.1.2 Die heterologe Produktion von Proteinen in Cyanobakterien	134
4.1.2 Strategien für zukünftige Arbeiten zur heterologen Produktion der SH	136

4.2 Charakterisierung der Hybridkomplexe aus Photosystem I und SH	138
4.3 Physiologische Untersuchungen an sauerstofftoleranten, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenasen.....	140
4.3.1 Einfluss der Aminosäureumgebung des HoxY FeS-Clusters auf die Sauerstofftoleranz der SH aus <i>R. eutropha</i>	141
4.3.2 Einfluss des Verlusts von HoxY auf die Maturation des SH-Komplexes	146
4.3.3 Die SH aus <i>R. opacus</i> : Ein alternatives Modellsystem	146
4.3.4 Ist Sauerstofftoleranz auf cyanobakterielle Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen transferierbar?	149
4.4 Fazit und Ausblick.....	151
ANHANG	153
LITERATURVERZEICHNIS	165
DANKSAGUNG	175
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	177

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AU	<i>arbitrary units</i> ; willkürliche Einheiten
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> ; Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromphenol-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
BV	Benzylviologen
Chl	Chlorophyll
Cm	Chloramphenicol
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1,-dimethylharnstoff, Diuron®
DCPIP	2,6-Dichlorophenolindophenol
DDM	n-dodecyl-β-D-maltopyranoside
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DT	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i> ; Elektronenspinresonanz
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> ; und andere
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot(-Spektroskopie)
h	Stunde(n)
His10	Decahistidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen(paare)
Km	Kanamycin
K-PO ₄	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
MBH	<i>membrane bound hydrogenase</i> ; membrangebundene Hydrogenase

MBH-PsaE	MBH-Derivat, aus HoxG und einem HoxK _{STOP} -PsaE-Strep-Fusionsprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MV	Methylviologen (Paraquat, 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium)
NADH	reduziertes Nictotinamid-Adenin-Dinucleotid
NAD ⁺	oxidiertes Nictotinamid-Adenin-Dinucleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
n.d.	<i>not determined</i> ; nicht bestimmt
NEB	New England Biolabs
NHE	<i>normal hydrogen electrode</i> ; Normalwasserstoffelektrode
NI	Normalliter
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i> ; Nitrilotriessigsäure
OD _{xxx}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PMS	Phenazinmethosulfat
psi	<i>pound-force per square inch</i> ; 1 psi = 6894,76 Pa
PSI	Photosystem I
RBS	Ribosombindestelle
rpm	<i>rotation per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RS	Restriktionsschnittstelle
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEIRAS	<i>Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy</i> ; Oberflächen-verstärkte Infrarot Absorptionsspektroskopie
SH	<i>soluble hydrogenase</i> ; lösliche, NAD ⁺ -reduzierende Hydrogenase
SHE	<i>standard hydrogen electrode</i> ; Standardwasserstoffelektrode
Spec	Spectinomycin
SV	Säulenvolumen
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Xx ^R	Restistenz(kassette) gegen das Antibiotikum Xx
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
β-EtSH	β-Mercaptoethanol
μE	Mikroeinsteinst, Einheit, die die Anzahl von Photonen angibt (1 μE = 1 μmol Photonen)

Einleitung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die funktionelle Charakterisierung der sauerstofftoleranten, NAD^+ -reduzierenden Hydrogenase (kurz SH für *soluble hydrogenase*) aus *Ralstonia eutropha* H16 sowie Versuche zum Einsatz der SH für die lichtgetriebene Wasserstoffproduktion in Cyanobakterien. Im Rahmen der Einleitung soll dieses schon seit über 40 Jahren untersuchte Enzym kurz vorgestellt werden und seine strukturelle und funktionelle Position in der Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen beleuchtet werden. Weiterhin werden die Grundlagen für die Anwendung der SH als Bestandteil eines zur lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion befähigten Komplexes aus Photosystem I und Hydrogenase vor allem im Hinblick auf das Konzept der cyanobakteriellen Designzelle erläutert.

1.1 Hydrogenasen

Enzyme, die die reversible Spaltung von molekularem Wasserstoff (H_2) in Protonen (H^+) und Elektronen (e^-) katalysieren, werden als Hydrogenasen bezeichnet. Es handelt sich hierbei um Metalloenzyme, die entsprechend des Aufbaus ihres aktiven Zentrums in folgende drei nicht phylogenetisch verwandte Klassen eingeteilt werden: [Fe]-, [FeFe]- und [NiFe]-Hydrogenasen (Vignais und Billoud, 2007). Die [Fe]-Hydrogenasen, welche auch als H_2 -bildene 5,10-Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenasen (Hmd) bezeichnet werden, treten nur in einer kleinen Gruppe methanogener Archaeen auf (Vignais und Billoud, 2007). Sie besitzen einen komplexen, eisenhaltigen Kofaktor jedoch keine Eisenschwefel-(FeS)-Zentren (Shima *et al.*, 2004, Vignais und Billoud, 2007). Die [FeFe]- und die [NiFe]-Hydrogenasen weisen dagegen neben dem aus zwei Eisen- bzw. einem Nickel- und einem Eisenatom aufgebauten aktiven Zentrum auch FeS-Zentren auf, die eine Weiterleitung von Elektronen innerhalb des Enzyms oder auf Elektronenakzeptoren/-donatoren ermöglichen (Vignais und Billoud, 2007). [FeFe]-Hydrogenasen treten sowohl in Prokaryoten, z. B. *Clostridium acetobutylicum*, als auch in niederen Eukaryoten, z. B. der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*, auf. Ihre physiologische Funktion ist in den meisten Fällen der Abbau überschüssiger Reduktionsäquivalente, d. h. sie produzieren H_2 mit Umsatzraten von bis zu $10\,000\text{ min}^{-1}$ (Vignais und Billoud, 2007, Stripp und Happe, 2009). Da ein Überschuss an Reduktionsäquivalenten mit anaeroben Bedingungen assoziiert ist, ist die extrem hohe Empfindlichkeit der [FeFe]-Hydrogenasen gegenüber Sauerstoff (O_2) natürlicherweise kein Problem. Sie stellt jedoch eine Herausforderung bei der biotechnologischen Anwendung der [FeFe]-Hydrogenasen dar (Lubner *et al.*, 2010b, Kruse und Hankamer, 2010). [NiFe]-

Hydrogenasen findet man in verschiedenen Bakterien und Archaeen. Sie treten anders als die [FeFe]-Hydrogenasen auch in Cyanobakterien auf. Die physiologische Funktion der [NiFe]-Hydrogenasen variiert, wobei die energiekonservierende H_2 -Oxidation am weitesten verbreitet ist (Vignais und Billoud, 2007). Von Vertretern aller drei Hydrogenase-Klassen gibt es Kristallstrukturen, die Einblicke in den Aufbau dieser komplexen Enzyme liefern (Shima und Thauer, 2007, Pilak *et al.*, 2006, Peters *et al.*, 1998, Volbeda *et al.*, 1995, Fritsch *et al.*, 2011b, Shomura *et al.*, 2011).

1.1.1 [NiFe]-Hydrogenasen

Im Allgemeinen bestehen [NiFe]-Hydrogenasen aus einer großen Untereinheit, die das aktive [NiFe]-Zentrum trägt, und einer kleinen Untereinheit, die in den meisten Fällen mit drei FeS-Clustern ausgestattet ist (Abb. 1). Das aktive Zentrum beinhaltet neben dem Nickel- und dem Eisenatom, die durch insgesamt vier Cysteinliganden koordiniert werden, drei diatomare Liganden (zwei CN^- - und einen CO-Liganden), die das Eisen offenbar während des gesamten katalytischen Zyklus im Fe^{2+} -Zustand halten (Abb. 1). Im aktiven [NiFe]-Zentrum wird H_2 zu $2 H^+$ und $2 e^-$ oxidiert. Die freiwerdenden, energiereichen Elektronen werden über die Kaskade der FeS-Cluster auf den physiologischen Elektronenakzeptor weitergeleitet, der entweder ein Protein oder ein löslicher Redoxfaktor sein kann. Die H_2 -produzierende Rückreaktion wird im physiologischen Kontext nur von einigen wenigen [NiFe]-Hydrogenasen katalysiert. Zur Charakterisierung der innerhalb des Hydrogenasekomplexes ablaufenden Redoxprozesse werden neben einer Vielzahl von biochemischen und elektrochemischen Verfahren auch verschiedene spektroskopische Methoden eingesetzt, darunter die Elektronenspinresonanz-(EPR – für *electron paramagnetic resonance*)-Spektroskopie sowie die Fourier-transformierte Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie (Lubitz *et al.*, 2007, Armstrong, 2004, Pandelia *et al.*, 2010, Horch *et al.*, 2012). Dabei ist die EPR-Spektroskopie sensitiv für ungepaarte Elektronen, die beispielsweise in reduzierten $[4Fe_4S]$ - und $[2Fe_2S]$ -Clustern sowie in $Ni^{1+/3+}$ -Zuständen auftreten. Mittels FTIR-Spektroskopie werden dagegen die Streckschwingungen der CO- und CN^- -Liganden detektiert. Die Schwingungsmodi dieser Liganden werden durch deren chemische Umgebung und den Redoxzustand des aktiven [NiFe]-Zentrums moduliert.

Die Assemblierung des aktiven [NiFe]-Zentrums ist ein komplexer Vorgang, der unter Beteiligung verschiedener Helferproteine abläuft (Böck *et al.*, 2006, Forzi und Sawers, 2007). Diese werden durch die konservierten *hyp*-Gene codiert, die ausnahmslos in allen Mikroorganismen gefunden werden, die funktionelle [NiFe]-Hydrogenasen produzieren.

Außerdem ist in der Regel eine für die jeweilige Hydrogenase spezifische Endopeptidase am Reifungsprozess beteiligt. Diese spaltet nach erfolgtem Einbau des aktiven [NiFe]-Zentrums ein etwa 25 Aminosäuren langes Peptid vom C-terminalen Ende der großen Hydrogenaseuntereinheit ab und ermöglicht so die Anlagerung der kleinen Hydrogenaseuntereinheit (Böck *et al.*, 2006).

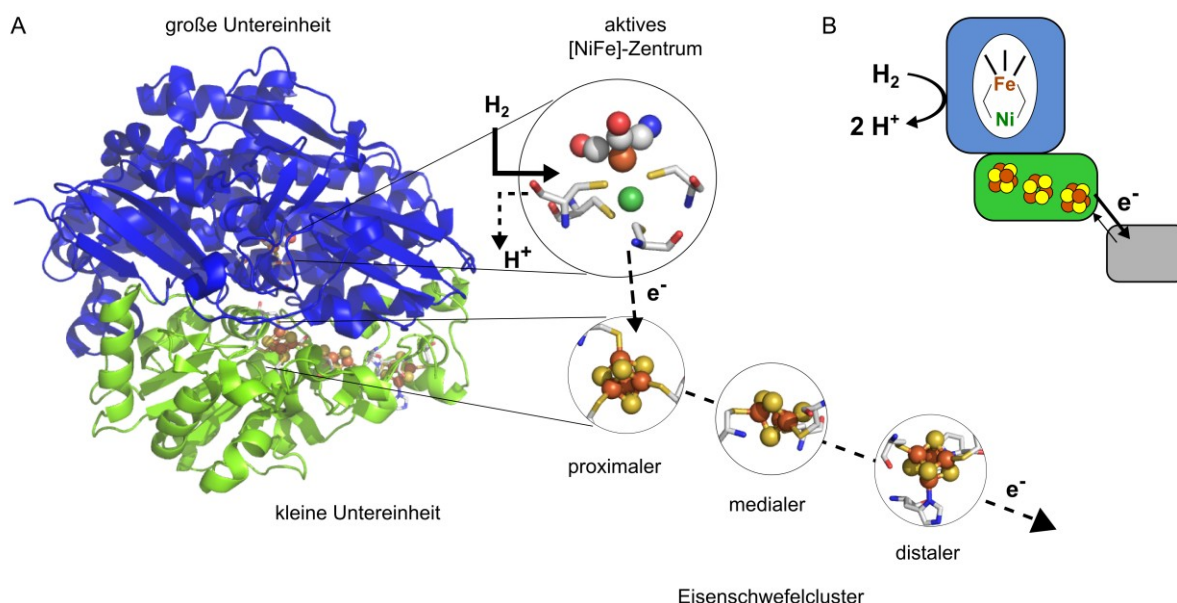


Abb. 1 Allgemeiner Aufbau der [NiFe]-Hydrogenasen. [NiFe]-Hydrogenasen bestehen aus einer großen Untereinheit (blau), die das aktive [NiFe]-Zentrum trägt, und einer kleinen Untereinheit (grün), die Eisenschwefelzentren enthält. Die Darstellungen in (A) basieren auf der Kristallstruktur der Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (1WUJ); Atome in den Detaildarstellungen sind entsprechend ihrer chemischen Natur gefärbt (C – grau, O – rot, S – gelb, N- blau, Fe – orange, Ni – grün). (B) zeigt das abstrahierte Modell einer Standard-[NiFe]-Hydrogenase.

Basierend auf den phylogenetischen Unterschieden der großen und kleinen Untereinheit wurden die [NiFe]-Hydrogenasen in vier strukturell und funktionell verschiedene Gruppen unterteilt (Vignais *et al.*, 2001). Kürzlich wurde diese Klassifikation um eine fünfte Gruppe erweitert (Constant *et al.*, 2011). Interessanterweise fand man bislang in vier der fünf Gruppen Hydrogenasen, die in der Lage sind, H₂ in Gegenwart von Sauerstoff (O₂) umzusetzen. Dies deutet darauf hin, dass sich verschiedene Mechanismen der Sauerstofftoleranz parallel entwickelt haben. Der gut untersuchte Modellorganismus *R. eutropha* H16 besitzt insgesamt vier O₂-tolerante [NiFe]-Hydrogenasen aus vier verschiedenen Gruppen (Burgdorf *et al.*, 2005a, Schäfer *et al.*, 2013). Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass in der regulatorischen Hydrogenase (RH), bei der es sich um eine Gruppe 2-[NiFe]-Hydrogenase

handelt, der Zugang von O₂ zum aktiven [NiFe]-Zentrum sehr wahrscheinlich durch einen verengten Gaskanal verhindert wird (Buhrke *et al.*, 2005). Aktuellere Arbeiten zeigen, dass die Sauerstofftoleranz einiger Gruppe 1-Hydrogenasen, unter anderem der membrangebundenen Hydrogenase (MBH) aus *R. eutropha*, mit einem ungewöhnlichen [4Fe3S]-Zentrum assoziiert ist (Goris *et al.*, 2011, Lukey *et al.*, 2011). Dieser proximal zum aktiven [NiFe]-Zentrum gelegene FeS-Cluster wird durch sechs statt durch die üblichen vier Cysteinreste koordiniert (Fritsch *et al.*, 2011b). Durch diese Konfiguration wird ein zweiter Redoxübergang dieses FeS-Clusters stabilisiert (Shomura *et al.*, 2011, Volbeda *et al.*, 2013, Frielingsdorf *et al.*, 2014). Das aktuelle Modell geht davon aus, dass durch dieses zusätzlich gespeicherte Elektron eine vollständige Reduktion von am [NiFe]-Zentrum angreifenden O₂ zu Wasser erleichtert wird und somit eine Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies verhindert werden kann (Lenz *et al.*, 2010, Fritsch *et al.*, 2013). Die Sauerstofftoleranzmechanismen der beiden verbleibenden Hydrogenasen aus *R. eutropha*, d. h. der SH (Gruppe 3-[NiFe]-Hydrogenase) und der Actinobakterien-Hydrogenase (AH) (Gruppe 5-[NiFe]-Hydrogenase), sind Gegenstand aktueller Forschung.

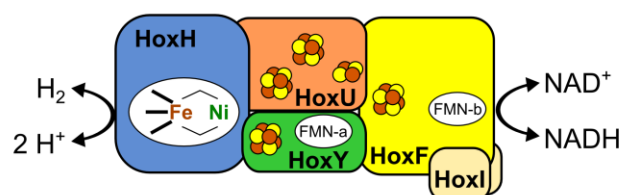
1.1.2 Pyridinnukleotid-abhängige [NiFe]-Hydrogenasen

Die SH aus *R. eutropha* gehört zu den Pyridinnukleotid-abhängigen (Gruppe 3d) [NiFe]-Hydrogenasen (Vignais und Billoud, 2007). In dieser Gruppe ist das Hydrogenasemodul, bestehend aus der großen Untereinheit HoxH und einer verkürzten Version der kleinen Untereinheit, HoxY genannt, mit einem NAD(P)H:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul assoziiert, das sich aus den Untereinheiten HoxF und HoxU zusammensetzt (Abb. 2). Das NAD(P)H:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu Untereinheiten aus dem cytoplasmatischen Teil von Komplex I der Atmungskette und koppelt die H₂-Oxidation (bzw. H⁺-Reduktion) an die Reduktion von NAD(P)⁺ (bzw. Oxidation von NAD(P)H). Entsprechend ihrer Untereinheitenzusammensetzung und der physiologischen Präferenz für die H₂-Oxidation bzw. die H⁺-Reduktion lassen sich die Pyridinnukleotid-abhängigen [NiFe]-Hydrogenasen weiter in zwei Untergruppen unterteilen (Horch *et al.*, 2012). Vertreter der ersten Untergruppe finden sich vor allem in cyanobakteriellen Spezies z. B. *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Nostoc* sp. PCC 7210 und werden deshalb im Folgenden auch als cyanobakterielle Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen bezeichnet. Die Enzyme dieser Gruppe zeichnen sich durch eine zusätzliche Untereinheit im NAD(P)H:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul aus, die als HoxE bezeichnet wird (vgl. Abb. 2). In der zweiten Untergruppe, deren bekannteste Vertreterin die sauerstofftolerante, lösliche Hydrogenase aus *R. eutropha* H16 ist, ist eine zu HoxE-homologe

Proteindomäne integraler Bestandteil der HoxF-Untereinheit. Die Enzyme der zweiten Gruppe zeichnen sich durch ihre O₂-Toleranz aus und werden deshalb im Folgenden als „aerob“ bezeichnet (Abb. 2). Eine zusätzliche, als HoxI bezeichnete Untereinheit des NAD(P)H:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls ist in den SH-Operons von *R. eutropha* und *R. opacus* codiert, jedoch nicht in allen Organismen zu finden, die eine Pyridinnukleotid-Hydrogenase des aeroben Typs besitzen (Schwartz *et al.*, 2003, Burgdorf *et al.*, 2005b, Grzeszik *et al.*, 1997, Maróti *et al.*, 2010).

A SH aus *R. eutropha* H16

als Beispiel einer "aeroben" Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenase



B cyanobakterielle Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenase

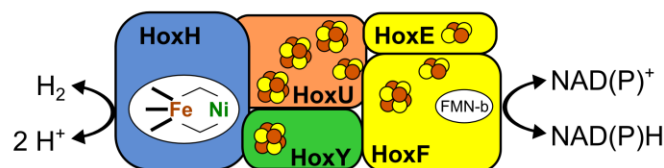


Abb. 2 Schematische Darstellung der zwei Typen der Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen.

Der „aerobe“ Typ ist am Beispiel der SH aus *R. eutropha* H16 gezeigt (A). Das Modell des cyanobakteriellen Typs wurde auf Grundlage der Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 erstellt (B). Die Untereinheiten des Hydrogenasemoduls (HoxH/HoxY) und des NAD(P)H:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls (HoxF/HoxU/(HoxE)/(HoxI)) sind mit ihren postulierten Kofaktoren, d. h. dem aktiven [NiFe]-Zentrum, den Flavinmononukleotid-(FMN)-Kofaktoren sowie den FeS-Clustern, dargestellt. Die HoxI-Untereinheit ist nur in den Operons einiger „aerobe“ Pyridinnukleotid-abhängiger Hydrogenasen codiert z. B. in *R. eutropha* H16 und in *R. opacus* MR11.

Die Hydrogenasen des cyanobakteriellen Typs produzieren unter physiologischen Bedingungen H₂ und dienen damit wahrscheinlich als Ventil für überschüssige Reduktionsäquivalente, die in den photosynthetisch aktiven Organismen unter anaeroben Bedingungen akkumulieren (Appel *et al.*, 2000, Gutekunst *et al.*, 2014). Da diese Enzyme jedoch auch die H₂-Oxidation katalysieren (Cournac *et al.*, 2004), werden sie in der Literatur oft auch als bidirektionale Hydrogenasen bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass die Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 bei der Katalyse in Gegenwart von O₂ ihre katalytische Aktivität verliert. Unter reduzierenden Bedingungen in Abwesenheit von O₂ konnte das

inaktivierte Enzym jedoch reaktiviert werden (McIntosh *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu bleibt die SH aus *R. eutropha*, die *in vivo* hauptsächlich die H₂-Oxidation betreibt, auch in der Gegenwart von O₂ katalytisch aktiv (Schneider *et al.*, 1979, Schneider und Schlegel, 1981). Aktuelle Arbeiten zeigen, dass beim Umsatz von H₂ in Gegenwart von O₂ Wasser sowohl im Hydrogenase- als auch im NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul der SH produziert wird (Lauterbach und Lenz, 2013). Dies deutet darauf hin, dass auch in dieser Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen wie in den O₂-toleranten membrangebundenen Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen die reduktive Entfernung von O₂ die Grundlage des Sauerstofftoleranzmechanismus ist (Lenz *et al.*, 2010, Fritsch *et al.*, 2013). Die strukturellen Grundlagen für die Unterschiede im katalytischen Verhalten der cyanobakteriellen und der aeroben Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenase wurden bislang noch nicht untersucht. Eine diesbezügliche Untersuchung wird durch die Tatsache erschwert, dass noch keine Kristallstruktur einer Pyridinnukleotid-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase verfügbar ist.

1.1.3 Die lösliche, NAD⁺-reduzierende Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha*

Die SH aus dem β -Proteobakterium *R. eutropha* H16 ist der bestcharakterisierteste Vertreter der Pyridinnukleotid-abhängigen [NiFe]-Hydrogenasen und wurde bereits in einer Vielzahl von *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien intensiv untersucht (Schneider und Schlegel, 1976, Schneider *et al.*, 1979, Kuhn *et al.*, 1984, Keefe *et al.*, 1995, Massanz *et al.*, 1998, Délécouls *et al.*, 1999, Burgdorf *et al.*, 2005b, Horch *et al.*, 2010, Lauterbach und Lenz, 2013). Die SH besteht aus einem Hydrogenasemodul, welches durch die Proteine HoxH (52,2 kDa) und HoxY (22,9 kDa) gebildet wird und einem NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul, welches sich aus den Proteinen HoxF (66,7 kDa), HoxU (26,0 kDa) und zwei Kopien von HoxI (18,6 kDa) zusammensetzt (Abb. 2., Burgdorf *et al.*, 2005b). Aktuelle FTIR-Untersuchungen an der SH haben gezeigt, dass HoxH ein aktives [NiFe]-Zentrum mit der Standardkonfiguration von einem CO- und zwei CN⁻-Liganden enthält (Horch *et al.*, 2010, Horch *et al.*, 2012). Die kleine Hydrogenaseuntereinheit der SH, HoxY, ähnelt der N-terminalen Domäne der kleinen Untereinheiten in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen und enthält ein konserviertes Bindemotiv für einen FeS-Cluster. Die Existenz dieses FeS-Clusters wurde durch Metallbestimmungen am isolierten HoxHY-Modul bestätigt (Lauterbach *et al.*, 2011b). Weiterhin deuten die Ergebnisse früherer Studien darauf hin, dass HoxY einen schwach gebundenen Flavinmononukleotid-(FMN)-Kofaktor (FMN-a) enthält, der jedoch bislang in keiner anderen [NiFe]-Hydrogenase beobachtet wurde (Schneider und Schlegel, 1978, van der Linden *et al.*, 2004, Lauterbach *et al.*, 2011b). Basierend auf konservierten Bindemotiven und einer Metallbestimmung am isolierten Protein werden für das NADH:Akzeptor-

Oxidoreduktasemodul der SH drei [4Fe4S]-Cluster, ein [2Fe2S]-Cluster und ein FMN-Kofaktor (FMN-b) angenommen (Lauterbach *et al.*, 2011a). Allerdings konnten in EPR-Studien an der reduzierten SH bislang nur Signale für ein [2Fe2S]⁺- und ein [4Fe4S]⁺-Cluster detektiert werden (Horch *et al.*, 2012, Schneider *et al.*, 1979). Diese Signale werden dem NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul zugeordnet, da eine sehr ähnliche EPR-Signatur auch für das isolierte HoxFU-Modul beobachtet wurde, während das isolierte HoxHY-Modul keinerlei EPR-Signale zeigte (Lendzian, Horch und Lauterbach – unveröffentlicht, Lauterbach *et al.*, 2011b). Das zeigt, dass das FeS-Cluster in HoxY unter den bislang verwendeten Bedingungen EPR-inaktiv ist.

Im physiologischen Kontext dient die SH als energiekonservierende Hydrogenase. Sie speichert die aus der Oxidation von H₂ gewonnene Energie in Form von NADH, welches unter anderem für die Fixierung von CO₂ über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus genutzt werden kann. Auf diesem Weg kann *R. eutropha* fakultativ chemolithoautotroph wachsen (Cramm, 2009). Aufgrund einer Unterbrechung der Signalweiterleitung innerhalb der H₂-sensierenden Proteinkaskade, die die regulatorische Hydrogenase mit einschließt, verbleibt die SH- und MBH-Genexpression im Wildtypstamm *R. eutropha* H16 unabhängig von der Präsenz von H₂ und erfolgt auch unter heterotrophen Wachstumsbedingungen (Lenz und Friedrich, 1998). Die 13 zur Produktion funktioneller SH benötigten Gene, die die fünf Strukturproteine und acht Reifungsfaktoren codieren, verteilen sich in *R. eutropha* auf zwei verschiedene Operons, wurden jedoch in früheren Arbeiten zur Etablierung eines Überexpressionssystems zu einem künstlichen „SH-Operon“ zusammengefügt (Tanja Burgdorf, unveröffentlicht/ veröffentlicht bei Lauterbach und Lenz, 2013).

1.1.4 Die lösliche, NAD⁺-reduzierende Hydrogenase aus *R. opacus* MR11

In dem Actinobakterium *Rhodococcus opacus* MR11 (ehemals *Nocardia opaca* 1b) ist ein zur SH aus *R. eutropha* homologes SH-Protein auf dem linearen Megaplasmid pHG201 codiert. Das wahrscheinlich durch lateralen Gentransfer in das Actinobakterium gelangte SH-Operon ist in Teilen sequenziert (Grzeszik *et al.*, 1997). Bekannt sind die Sequenzen der die SH-Untereinheiten codierenden Gene *hoxF*, *hoxU*, *hoxY*, *hoxH* sowie das Gen der für die Maturation benötigten Endopetidase HoxW. Vom Gen der HoxI-Untereinheit wurde nur das 3'-Ende sequenziert. Die für die Maturation des Hydrogenasekomplexes essentiellen *hyp*-Gene sind nicht bekannt. Die bekannten Gensequenzen zeigen, dass die Proteine der SH aus *R. opacus* zwischen 79-86 % Sequenzidentität zu den Proteinen aus *R. eutropha* besitzen. Trotz dieser hohen Ähnlichkeit haben frühere Arbeiten gezeigt, dass sich die SH aus

R. opacus in einigen wesentlichen Eigenschaften vom *R. eutropha*-Enzym unterscheidet (Schneider *et al.*, 1984b, Schneider *et al.*, 1984a, Zaborosch *et al.*, 1995). So zeigt die SH aus *R. opacus* H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität nur in Gegenwart von Ni²⁺-Ionen (und einigen anderen zweiwertigen Kationen) oder hoher Salzkonzentration. In Abwesenheit von Ni²⁺ wurde ein Zerfall des SH-Komplexes in seine Module beobachtet, wodurch ohne genetische Manipulation eine unabhängige Charakterisierung des Hydrogenase- und des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktaseteils möglich wird. Das Hydrogenasedimer der SH aus *R. opacus* zeigte bei EPR-spektroskopischen Untersuchungen deutliche Signale, die auf ein [4Fe4S]-Cluster hindeuten (Zaborosch *et al.*, 1995).

Da die SH in *R. opacus* nur unter lithoautotrophen Bedingungen produziert wird, wurden Versuche unternommen, ein System zur heterologen Produktion des Enzyms in *R. eutropha* zu etablieren (Porthun *et al.*, 2002). Die funktionelle Produktion der SH aus *R. opacus* konnte dabei demonstriert werden, wobei die Reinigung des Enzyms mit klassischen chromatographischen Verfahren aufgrund der zu geringen Stabilität nicht möglich war (A. Gebler – persönliche Kommunikation).

1.2 Die cyanobakterielle Designzelle

In Anbetracht schrumpfender Reserven von fossilen Energieträgern und zunehmender Umweltprobleme durch den unvermindert anhaltenden Ausstoß von Treibhausgasen wie Kohlenstoffdioxid ist die Nutzbarmachung des biotechnologischen Potentials phototropher Mikroorganismen ein wichtiges Forschungsfeld. Diese Mikroorganismen, deren wichtigste Vertreter die Cyanobakterien sind, vermögen es unter der Nutzung der quasi unerschöpflichen Energiequelle Sonnenlicht Biokraftstoffe und andere Chemikalien, die bislang aus fossilen Quellen gewonnen werden, zu produzieren (Liu *et al.*, 2011, Lindberg *et al.*, 2010, Ducat *et al.*, 2011b). Dabei wird kurz- bis mittelfristig CO₂ gebunden und global betrachtet, ergibt sich ein CO₂-neutraler Stoffkreislauf.

Cyanobakterien nutzen zur CO₂-Fixierung wie höhere Pflanzen die oxygene Photosynthese. Die Lichtreaktion der Photosynthese, die in den Thylakoiden stattfindet, wird vom Photosystem II, dem Cytochrom b₆f-Komplex und Photosystem I (PSI) katalysiert (Abb. 3).

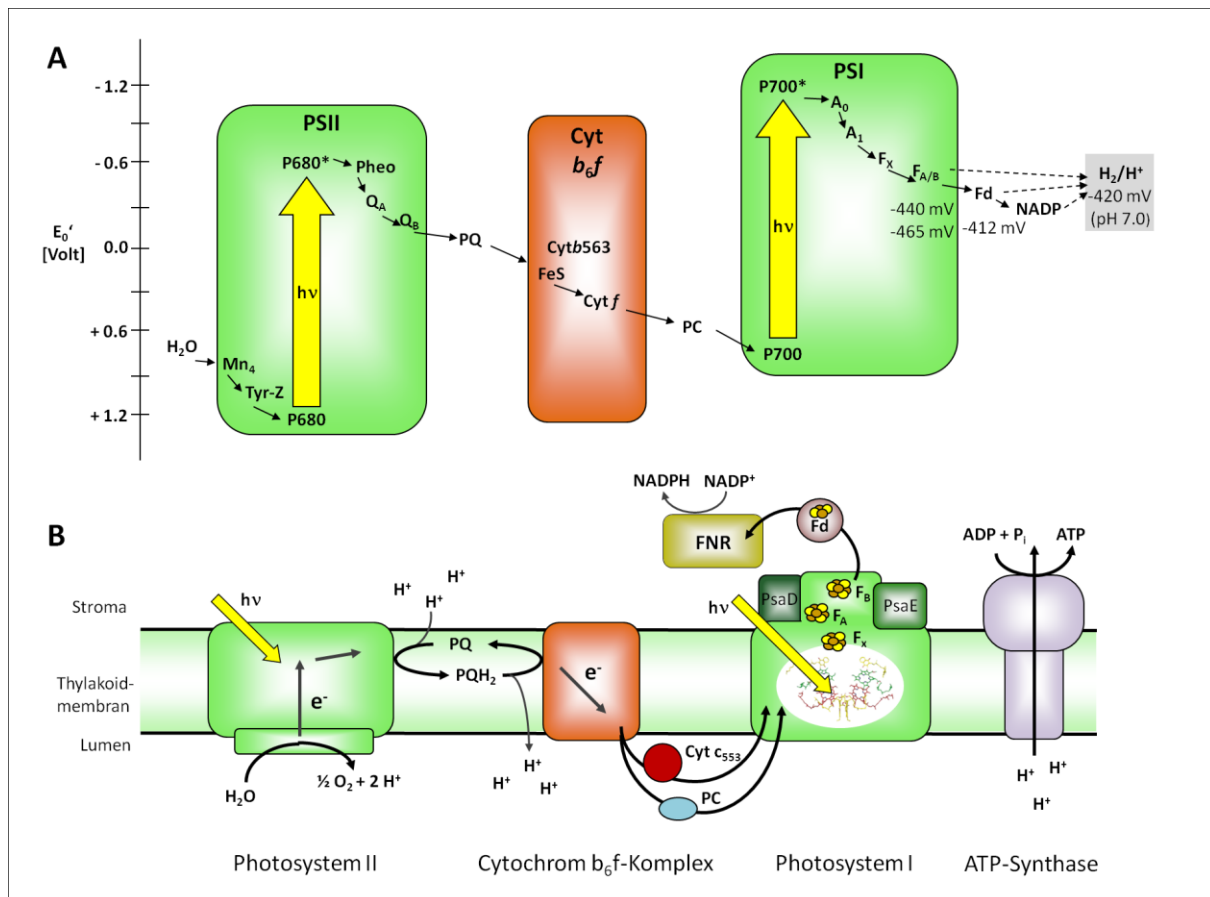


Abb. 3 Modell der Thylakoidmembran und des linearen Elektronentransports in Cyanobakterien.

(A) Elektronentransport durch das Photosystem II (PSII), den Cytochrom b₆f-Komplex und das Photosystem I (PSI) mit Darstellung der Redoxpotentiale (E_0') der Kofaktoren (Z-Schema) (adaptiert aus A. Schwarze, 2010, S. 5). (B) Modell der Thylakoidmembran mit Komplexen, die am linearen Elektronentransport der oxygenen Photosynthese beteiligt sind (vereinfacht nach Bryant, D. A., 1994, Color Plate 1). A_0 : primärer Akzeptor des PSI (Chl a Monomer), A_1 : sekundärer Akzeptor des PSI (Phyllochinon), Cyt: Cytochrom, Fd: Ferredoxin (PetF), FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase, $F_X/F_A/F_B$: Eisenschwefel-Cluster des PSI, $h\nu$: Photonen, Mn₄: Mangan-Cluster des PSII, P680/P700: primäre Donorchlorophylle der Photosysteme, PsaE/PsaD: periphere Untereinheiten des PSI, Pheo: Pheophytin, PC: Plastocyanin, PQ: Plastochinon, PQH₂: reduziertes Plastochinon, Q_A/Q_B : Plastochinone des PSII, Tyr-Z: Mn-Cluster reduzierendes Tyrosin des PSII

An den terminalen Eisenschwefelzentren des PS I, F_A und F_B , werden dabei Elektronen mit einem Redoxpotential von -440 mV vs. SHE freigesetzt (Brettel und Leibl, 2001). Im natürlichen System dienen diese der Reduktion von Ferredoxin, welches die Reduktionskraft über die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase weiter auf NADP⁺ überträgt. Außerdem kommt es über der Thylakoidmembran zur Ausbildung eines Protonengradienten, dessen protonmotorisches Potential durch die ATP-Synthase für die Bildung von ATP genutzt wird. Die im NADPH und ATP gespeicherte Energie wird in der Dunkelreaktion der Photosynthese für den Aufbau energiereicher Kohlenstoffverbindungen aus CO₂ genutzt. Während die Elektronentransportprozesse innerhalb der Photosysteme sehr effizient ablaufen, ist die

Bildung chemischer Verbindungen immer auch mit Verlusten in Form von Wärme behaftet. So werden in Cyanobakterien während des Gesamtprozesses der oxygenen Photosynthese maximal 3-9 % der eingestrahnten Lichtenergie in chemische Energie von Kohlenstoffverbindungen umgewandelt (Ducat *et al.*, 2011b, Dismukes *et al.*, 2008). Das heißt, je direkter die durch Anregung mit Sonnenlicht generierten, energiereichen Elektronen in einem Biokraftstoff gespeichert werden, desto effizienter wird der Prozess. Hieraus ergibt sich eine Sonderstellung von H₂ als Biokraftstoff, da er ohne den verlustbehafteten “Umweg“ der CO₂-Fixierung produziert werden kann (Ducat *et al.*, 2011b). Weiterhin wird H₂ aus den Zellen freigesetzt, ohne dass eine energieaufwendige Aufarbeitung nötig ist. Natürlicherweise produzieren Cyanobakterien wie *Synechocystis* sp. PCC 6803 jedoch, wenn überhaupt nur geringe Mengen an H₂ um ihren Energiehaushalt zu regulieren (Appel *et al.*, 2000, Cournac *et al.*, 2004, Gutekunst *et al.*, 2014). Es sind also genetische Anpassungen eines cyanobakteriellen Ausgangsorganismus notwendig, um die Produktion von H₂ zu maximieren und den Erhaltungsstoffwechsel der Zelle auf ein notwendiges Minimum zu reduzieren (Rögner, 2013). Im Kooperationsprojekt „H₂-Designzelle“ wurden deshalb verschiedene Ansatzpunkte für die Etablierung eines solch optimierten H₂-Produzenten ausgearbeitet (siehe auch Rögner, 2013). Für einen *Proof-of-concept* sollten diese Modifikationen zunächst unabhängig voneinander in dem genetisch einfach zu manipulierenden cyanobakteriellen Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 etabliert werden. Erstens sollte eine Reduktion der photosynthetischen Antennenkomplexe, der Phycobilisomen, angestrebt werden, um eine Übersättigung der Elektronentransportkette bei hohen Lichtintensitäten zu vermeiden und gleichzeitig eine höhere Penetranz des Lichts in den cyanobakteriellen Kulturen zu ermöglichen. Außerdem sollte die Mutagenese der photosynthetischen Antennenkomplexe Energie des Zellstoffwechsels sparen, da die Phycobilisomen bis zu 63 % der löslichen Proteine der Zelle ausmachen können (Rögner, 2013). Zweitens sollten der lineare Elektronentransport und das protonenmotorische Potential über der Thylakoidmembran teilweise entkoppelt werden, um so die Raten des für die H₂-Produktion benötigten photosynthetischen Elektronentransports steigern zu können (Rögner, 2013). Dazu sollte durch Deletion einer Domäne der ATPase, die Thylakoidmembran teilweise für H⁺ permeabilisiert werden (Rögner, 2013). Als dritter für die lichtabhängige H₂-Produktion wesentlicher Punkt sollte die photosynthetische Elektronentransportkette mit einer O₂-toleranten Hydrogenase gekoppelt werden. Zwei unabhängige Strategien sollten hierfür im Rahmen des „H₂-Designzelle“-Projekts getestet werden. Einerseits war eine Kopplung von [FeFe]-Hydrogenasen über das Ferredoxin vorgesehen, denn Ferredoxine sind die natürlichen Elektronendonatoren der [FeFe]-Hydrogenase. Dazu sollten auch [FeFe]-

Hydrogenasevarianten mit einer erhöhten Sauerstofftoleranz durch gerichtete Evolution etabliert werden (Rögner, 2013). Andererseits sollte durch die Fusion der O₂-toleranten SH aus *R. eutropha* mit den peripheren Untereinheiten des PSI eine Kopplung nach dem Vorbild der MBH-PSI-Hybridkomplexe erreicht werden (Ihara *et al.*, 2006, Krassen *et al.*, 2009, Schwarze *et al.*, 2010). Eine genauere Beschreibung dieser Projektidee findet sich im folgenden Kapitel.

1.2.1 Hydrogenase-PSI-Hybridkomplexe

Um die in der Lichtreaktion der Photosynthese generierten Elektronen auf dem Potential von rund -440 mV vs. SHE für eine Reduktion von H⁺ zu H₂ nutzbar zu machen, müssen diese Elektronen möglichst verlustfrei auf einen geeigneten Katalysator übertragen werden. Prinzipiell können dies sowohl anorganische, z. B. Platinpartikel, als auch biologische Katalysatoren, z. B. Hydrogenasen, sein (Iwuchukwu *et al.*, 2010, Lubner *et al.*, 2010b, Ihara *et al.*, 2006). Soll die lichtgetriebene Wasserstoffproduktion jedoch im lebenden Organismus ablaufen, was die Vorteile bietet, dass das System automatisch assembliert und repariert wird und dass keine aufwendige Aufarbeitung der photosynthetischen Proteinkomplexe notwendig ist, entfällt die Möglichkeit anorganische Katalysatoren einzusetzen. Auch der Einsatz von *nanowires* zur Kopplung von PSI und Hydrogenase (Lubner *et al.*, 2010a, Lubner *et al.*, 2011) ist *in vivo* nur schwer vorstellbar. Für ein funktionelles *In-vivo*-System sollte also eine effiziente Elektronenübertragung zwischen PSI und Hydrogenase entweder durch lösliche Elektronenmediatoren, wie z. B. Ferredoxin, oder durch die Ausbildung eines Komplexes, der die FeS-Zentren des PSI und der Hydrogenase in räumliche Nähe bringt, erfolgen. Dass durch Fusion der peripheren PSI-Untereinheit PsaE mit der MBH aus *R. eutropha* die Ausbildung eines Hybridkomplexes mit PsaE-freiem PSI forciert werden kann, der zur lichtabhängigen H₂-Produktion befähigt ist, wurde erstmals durch Ihara *et al.*, 2006 gezeigt. Eine quantitative Charakterisierung des MBH^{PsaE}-PSIΔPsaE-Hybridkomplexes auf einer funktionalisierten Goldelektrode zeigte, dass dieses System bis zu 4500 μmol H₂ min⁻¹ mol⁻¹ Hybridkomplex produzieren kann (Krassen *et al.*, 2009, Schwarze *et al.*, 2010). Da eine heterologe Produktion des MBH-Komplexes als löslicher Proteinkomplex in Cyanobakterien nicht zuletzt auch aufgrund der komplexen Reifung der MBH (Fritsch *et al.*, 2013) nicht trivial erscheint, wurden von Alexander Schwarze in Analogie zur MBH-PsaE-Fusion Fusionsproteine der SH aus *R. eutropha* mit den peripheren Untereinheiten des PSI aus *Synechocystis* etabliert (A. Schwarze, 2010) (Abb. 4). Die SH besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu den in Cyanobakterien vorkommenden Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen (siehe 1.1.2), so dass eine heterologe Produktion dieser O₂-toleranten Hydrogenase in einem cyanobakteriellen Wirt

möglich scheint. Wie in der MBH-PsaE-Fusion wurde die periphere Untereinheit des PSI, PsaE bzw. eine C-terminal verkürzte Version des PsaD-Proteins (PsaD_{ΔClamp}), auch hier mit der kleinen Hydrogenaseuntereinheit, HoxY, der SH fusioniert (A. Schwarze, 2010, S. 92f). Diese Fusion erfolgte jedoch anders als im HoxK(MBH)-PsaE-*Strep*-Protein am N-Terminus des HoxY-Proteins, so dass die Proteine *Strep*-PsaE-HoxY bzw. *Strep*-PsaD_{ΔClamp}-HoxY von den entsprechenden Stämmen gebildet werden. Außerdem wurde auch eine *Strep*-PetF-HoxY-Fusion mit dem Ferredoxin PetF, dem natürlichen Elektronenakzeptor des PSI, etabliert (A. Schwarze, 2010, S. 92f). Es wurde bereits gezeigt, dass die entsprechend modifizierten SH-Komplexe katalytisch aktiv sind (A. Schwarze, 2010, S. 96). Weiterhin konnte für die PsaE-SH- und PsaD-SH-Komplexe eine Zusammenlagerung zu stabilen Hybridkomplexen mit den entsprechenden PSI-Derivaten, PSIΔPsaE und PSIΔPsaD, in BlueNative-PAGE-Experimenten demonstriert werden (A. Schwarze, 2010, S. 97). Eine Demonstration der lichtabhängigen H₂-Produktion durch diese Hybridkomplexe war jedoch noch nicht erfolgt.

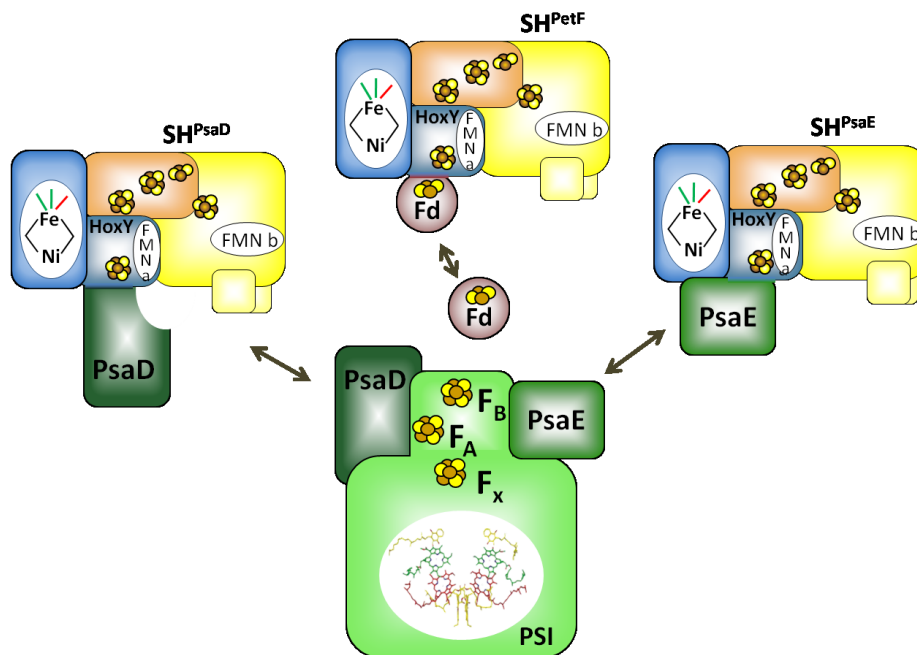


Abb. 4 Modell der SH-Fusionen mit den peripheren Untereinheiten des Photosystem I (PSI), PsaE und PsaD, sowie mit dem löslichen Ferredoxin (Fd), PetF (adaptiert aus A. Schwarze, 2010, S. 94). Ziel der Fusionen war es Hybridkomplexe zu etablieren, in denen ein effizienter Elektronenübergang vom terminalen FeS-Cluster des PSI F_B (bzw. vom [2Fe2S]-Cluster des Fd) auf den FeS-Cluster in HoxY möglich wird. PsaE/PetF/PsaD wurden an den N-Terminus der kleinen Hydrogenaseuntereinheit HoxY fusioniert. Im PsaD-HoxY-Fusionsprotein wurde die C-terminale Domäne von PsaD deletiert.

Um zu demonstrieren, dass die SH bzw. deren Derivate funktionell in dem cyanobakteriellen Modellorganismus *Synechocystis* produziert werden können, wurde von Alexander Schwarze

ein Weitwirtsplasmid-basiertes Expressionssystem für die Wildtyp-SH etabliert. Dieses 24,7 kb-große Plasmid konnte jedoch nicht stabil in *Synechocystis* übertragen werden (A. Schwarze, 2010, S. 105). Deshalb wurde von Caspar Schäfer und Alexander Schwarze ein Plasmid zur genomischen Integration des SH-Operons unter Kontrolle des Cu^{2+} -abhängigen *petJ*-Promotors konstruiert (C. Schäfer und A. Schwarze - persönliche Kommunikation). Der Einsatz dieses pSK_SH-Plasmids für die homologe Rekombination in *Synechocystis* stand jedoch noch aus.

1.3 Ausgangspunkt und Zielsetzung dieser Arbeit

Die SH aus *R. eutropha* katalysiert die H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktion in der Gegenwart von O_2 (Schneider und Schlegel, 1981, Lauterbach und Lenz, 2013). Diese für Hydrogenasen seltene Eigenschaft der Sauerstofftoleranz stellt die SH aus *R. eutropha* in den Focus der Grundlagen- und anwendungsbezogenen Forschung. Neben der energiekonservierenden H_2 -Oxidation ist die SH auch zur NADH -abhängigen H_2 -Produktion befähigt (Schneider und Schlegel, 1976, Kuhn *et al.*, 1984). Basierend auf diesen beiden Eigenschaften wurde bereits in vorangegangenen Projekten eine Nutzung der SH für die lichtgetriebene H_2 -Produktion in einer cyanobakteriellen Designzelle vorgeschlagen (A. Schwarze, 2010). Das dazu erarbeitete Konzept sieht vor, die SH über das PSI mit der photosynthetischen Elektronentransportkette in einem cyanobakteriellen Wirt zu koppeln. Dazu wurden von Alexander Schwarze SH-Fusionsproteine etabliert, die sich, wie gezeigt werden konnte, mit entsprechenden PSI-Derivaten zu Hybridkomplexen zusammenlagern (siehe 1.2.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Hybride aus *Synechocystis* PSI und der SH aus *R. eutropha* nun hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum intermolekularen Elektronentransfer und einer daraus resultierenden lichtabhängigen H_2 -Produktion untersucht werden. Hierfür sollten verschiedene für die biochemische und elektrochemische Charakterisierung des PSI etablierte Ansätze zum Einsatz kommen (Iwuchukwu *et al.*, 2010, Krassen *et al.*, 2009, Badura *et al.*, 2011a). Parallel dazu sollte ein heterologes Expressionssystem der SH in cyanobakteriellen Wirtsorganismen etabliert werden. Hierbei sollte zunächst mit dem die wildtypische SH codierenden „SH-Operon“ gearbeitet werden, um die Interaktion mit dem cyanobakteriellen Zellstoffwechsel zu minimieren. Auch für dieses Projekt lagen bereits Vorarbeiten von Alexander Schwarze im cyanobakteriellen Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 vor (siehe 1.2.1), welche hier weiterverfolgt und weiterentwickelt werden sollten. Da zu Beginn dieser Arbeit über die heterologe Produktion von [NiFe]-Hydrogenasen in *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *S. elongatus* PCC 7942 berichtet wurde (Y. Xu, 2010, Weyman *et al.*, 2011), sollten die

Bemühungen, das 13 Gene codierende „SH-Operon“ in einen cyanobakteriellen Organismus zu übertragen, hier auf diese Wirtsorganismen ausgeweitet werden.

Ein alternativer Ansatz zur heterologen Produktion der O₂-toleranten Pyridinnukleotid-abhängigen [NiFe]-Hydrogenase in einem cyanobakteriellen Wirtsorganismus ist die Umwandlung der endogenen cyanobakteriellen, O₂-sensitiven Hydrogenasen in O₂-tolerante Enzymkomplexe. Dafür ist ein grundlegendes Verständnis des Sauerstofftoleranz-mechanismus der aeroben Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen notwendig, zu dem mit dieser Arbeit beigetragen werden soll. Bereits bekannt war, dass frisch isolierte SH aus *R. eutropha* durch katalytische Mengen an NADH reaktiviert werden kann (Schneider und Schlegel, 1976, Keefe *et al.*, 1995). Ein entsprechendes Modell geht davon aus, dass durch rückläufigen Elektronentransport vom NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul zum Hydrogenasemodul letzteres vor irreversiblen Schäden durch O₂ geschützt wird. Es stellte sich jedoch die Frage, inwieweit und wodurch sich der rückläufige Elektronentransport in den aeroben Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen von in den ebenfalls bidirektional arbeitenden, cyanobakteriellen Enzymen unterscheidet. In einigen membrangebundenen, O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1 war der proximal zum aktiven Zentrum gelegene FeS-Cluster in der kleinen Hydrogenaseuntereinheit als wichtige Determinante der Sauerstofftoleranz identifiziert worden (Goris *et al.*, 2011, Lukey *et al.*, 2011). Ausgehend von der Hypothese, dass ein Cluster mit analoger Funktion in der SH aus *R. eutropha* vorliegen könnte, sollten hier die konservierten und potentiell zusätzlichen Koordinationsstellen des FeS-Clusters in der HoxY-Untereinheit systematisch ausgetauscht werden, um so ihre Relevanz für die Aktivität und Sauerstofftoleranz des SH-Komplexes zu prüfen. In einer parallel zu dieser Arbeit angefertigten Bachelorarbeit, die sich mit der Identifikation von Koordinationsstellen des postulierten FMN-Kofaktors in HoxY befasst hatte, wurde außerdem der nahe zum HoxY-Cluster gelegene Tryptophanrest W42 als relevant für die H₂:NAD⁺-Oxidoreduktaseaktivität des SH-Komplexes identifiziert (M. Grunzel, 2012). Der Einfluss der entsprechenden Aminosäuresubstitution W42S auf das aktive Zentrum und den HoxY FeS-Cluster sollte hier deshalb ebenfalls weiter untersucht werden.

Die SH aus *R. eutropha* H16 lässt sich unter heterotrophen Wachstumsbedingungen produzieren und kann in großen Mengen aufgearbeitet werden (Schneider und Schlegel, 1976, Burgdorf *et al.*, 2005b, Lauterbach und Lenz, 2013). Dennoch besitzt dieses Modellsystem einige Limitationen. So ist bislang für die gesamte Gruppe der Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen keine Kristallstruktur verfügbar und Versuche die SH aus *R. eutropha* zu kristallisieren blieben bislang erfolglos. Auch lässt sich der SH-Komplex aus *R. eutropha* nur

auf Umwegen in seine Module aufspalten, so dass spektroskopische Untersuchungen in der Regel am heterohexameren (bzw. heterotetrameren) SH-Protein durchgeführt werden. Damit werden bei der Charakterisierung des Hydrogenaseteils jedoch immer auch Signale der FeS-Zentren des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul detektiert. In spektroskopischen Studien am isolierten Hydrogenasemodul zeigte sich der FeS-Cluster in HoxY zudem EPR-inaktiv. Das aus früheren Arbeiten der Schlegel-Gruppe bekannte homologe SH-Protein aus *R. opacus* scheint in dieser Hinsicht einige Vorteile zu besitzen. So lässt sich dieser Proteinkomplex leicht in seine Module aufspalten (Schneider *et al.*, 1984a, Zaborosch *et al.*, 1995). Außerdem konnte für das Hydrogenasemodul der SH aus *R. opacus* ein $[4Fe4S]^+$ -Cluster-spezifisches EPR-Signal beobachtet werden (Zaborosch *et al.*, 1995). Um diese Vorteile nutzbar zu machen, sollte in dieser Arbeit die SH aus *R. opacus* als komplementäres Modellsystem für aerobe Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen etabliert werden.

Material und Methoden

2.1 Plasmide und Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Bakterienstämme sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 1 und Tab. 2) aufgeführt. Zur Langzeitkonservierung der Bakterienstämme wurden je 1,6 ml einer in selektivem Medium dichtgewachsene Kultur mit 15 % (w/v) Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Eine weitere Übersicht zu den auf den standardisierten „SH-Bausteinen“-basierenden Plasmiden pDAK27-pDAK86 ist im Anhang in Tab. S3 dargestellt.

Tab. 1 Plasmide

Plasmide	Relevante Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
LITMUS28	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , P _{lac} - <i>lacZ'</i> , BglII-KpnI-MCS	New England Biolabs
LITMUS29	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , P _{lac} - <i>lacZ'</i> , KpnI-BglII-MCS	New England Biolabs
pLO3	Tet ^R , <i>sacB</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	Lenz und Friedrich, 1998
pSK9	Amp ^R , Cm ^R , ColE1 <i>ori</i> , Integrationsplattform mit 3'- <i>sll1513-sll151</i> (<i>Syn</i> 6803) und 3'- <i>slr1597</i> (<i>Syn</i> 6803), P _{petA} (<i>Syn</i> 6803)-NdeI	Kuchmina <i>et al.</i> , 2012
pCH1428	pVZ321-Derivat mit P _{psbAII} (<i>Syn</i> 6803)- <i>strep-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEXhoxA'</i> (<i>ReH16</i>)	A. Schwarze, 2010
pSK_SH	pSK9-Derivat mit P _{petA} (<i>Syn</i> 6803)- <i>strep-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEXhoxA'</i> (<i>ReH16</i>)	Alexander Schwarze/ Caspar Schäfer (unveröffentlicht)
#2904	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , 14924bp-HindIII-Fragment mit <i>strep-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEXhoxA'</i> aus <i>ReH16</i> in LITMUS28/HindIII	J. Hamann/O. Lenz (unveröffentlicht)
pDAK41	phosphoryliertes 977 bp-PCR-Produkt ka55/ka56/ka57 mit <i>hyp'X</i> (ohne NdeI)-SpeI/NotI/SbfI/HindIII/XbaI in LITMUS29/SnaBI+StuI	diese Arbeit
pDAK27	971 bp-MfeI/XbaI-Fragment aus pDAK41 mit <i>hyp'X</i> (ohne NdeI)-SpeI/NotI/SbfI/HindIII in #2904/MfeI+SpeI	diese Arbeit
pDAK28	929 bp-PCR-Produkt ka43/ka44 mit AvrII/BsrGI/HindIII/NotI/XbaI-P _{nrsB} (<i>Syn</i> SD102)-NdeI- <i>strep'</i> -BstBI in LITMUS29/EcoRV	diese Arbeit
pDAK29	896 bp-XbaI/BstBI-Fragment aus pDAK28 mit P _{nrsB} (<i>Syn</i> SD102)-NdeI- <i>strep'</i> in pDAK27/XbaI+BstBI	diese Arbeit
pDAK30	5630 bp-NdeI/TatI-Fragment aus pDAK28 mit <i>strep-hoxFUYHWT'</i> und Linker aus ka45/ka46 mit <i>hox'I_{Stop}</i> pDAK29/NdeI+SpeI	diese Arbeit
pDAK31	phosphoryliertes 1224 bp-PCR-Produkt ka47/48 mit NdeI- <i>hypA2B2'</i> in LITMUS29/EcoRV	diese Arbeit
pDAK32	1212 bp-NdeI/AgeI-Fragment aus pDAK31 mit <i>hypA2B2'</i> in pDAK29/NdeI+AgeI	diese Arbeit
pDAK33	phosphoryliertes 1056 bp-PCR-Produkt ka49/ka50 mit <i>nrs'C</i> (<i>Syn</i> SD102) in LITMUS29/SnaBI+StuI	diese Arbeit
pDAK34	1035 bp-XbaI/PstI-Fragment aus pDAK33 mit <i>nrs'C</i> in pDAK29/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK35	1035 bp-XbaI/PstI-Fragment aus pDAK33 mit <i>nrs'C</i> in pDAK30/SpeI+SbfI	diese Arbeit

pDAK36	1035 bp-XbaI/PstI-Fragment aus pDAK33 mit <i>nrs</i> 'C in pDAK32/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK37	phosphoryliertes 190 bp-PCR-Produkt ka51/ka52 mit P_{psbAll} (<i>Syn</i> WT) in LITMUS29/SnaBI+StuI	diese Arbeit
pDAK38	177 bp-XbaI/NdeI-Fragment aus pDAK37 mit P_{psbAll} in pDAK29/XbaI+NdeI	diese Arbeit
pDAK39	177 bp-XbaI/NdeI-Fragment aus pDAK37 mit P_{psbAll} in pDAK30/XbaI+NdeI	diese Arbeit
pDAK40	177 bp-XbaI/NdeI-Fragment aus pDAK37 mit P_{psbAll} in pDAK32/XbaI+NdeI	diese Arbeit
pVZ321	Cm^R , Km^R , RSF1010 (<i>mob</i> ⁺ , IncQ)	Zinchenko <i>et al.</i> , 1999
pDAK42o1	14014 bp-XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK38 mit P_{psbAll} - <i>strep-hoxFUYHWIhypA2B2F2CDEX</i> in pVZ321/XbaI (Cm^R <i>upstream</i> der Expressionskassette und <i>in sense</i>)	diese Arbeit
pDAK42o2	14014 bp-XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK38 mit P_{psbAll} - <i>strep-hoxFUYHWIhypA2B2F2CDEX</i> in pVZ321/XbaI (Cm^R <i>downstream</i> der Expressionskassette und <i>in antisense</i>)	diese Arbeit
pDAK51	894 bp-AvrII/NdeI-Fragment aus pDAK28 mit BsrGI/HindIII/NotI/XbaI- P_{nrsB} in pDAK29/AvrII+NdeI	diese Arbeit
pDAK52	894 bp-AvrII/NdeI-Fragment aus pDAK28 mit BsrGI/HindIII/NotI/XbaI- P_{nrsB} in pDAK30/AvrII+NdeI	diese Arbeit
pDAK53	894 bp-AvrII/NdeI-Fragment aus pDAK28 mit BsrGI/HindIII/NotI/XbaI- P_{nrsB} in pDAK32/AvrII+NdeI	diese Arbeit
pDAK55_o1	8241 bp XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK40 mit P_{psbAll} - <i>hypA2B2F2CDEX</i> in pDAK39/SpeI (<i>hox</i> - und <i>hyp</i> -Gene <i>in sense</i>)	diese Arbeit
pDAK55_o2	8241 bp XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK40 mit P_{psbAll} - <i>hypA2B2F2CDEX</i> in pDAK39/SpeI (<i>hox</i> - und <i>hyp</i> -Gene <i>in antisense</i>)	diese Arbeit
BBa_B0015	Amp^R , Km^R , ColE1 <i>ori</i> , BBa_B0015: double terminator (T1 aus <i>E. coli rrnB</i> und TE aus dem <i>E. coli</i> -PhageT7)	Registry of Standard Biological Parts
pDAK61	158 bp XbaI/SpeI-Fragment mit double terminator (T1 aus <i>E. coli rrnB</i> und TE aus dem <i>E. coli</i> -PhageT7) aus BBa_B0015 in pDAK33/XbaI	diese Arbeit
BBa_E0030	Amp^R , Km^R , ColE1 <i>ori</i> , BBa_E0030: <i>eyfp</i> (codierte ein enhanced yellow fluorescent Protein – ein Derivat des GFP aus <i>A. victoria</i>)	Registry of Standard Biological Parts
pDAK62	PCR-Produkt ka75/76 mit ' <i>strep-eyfp</i> in pDAK52/BstBI+SpeI	diese Arbeit
pDAK63	177 bp XbaI/NdeI-Fragment aus pDAK38 mit P_{psbAll} in pDAK62/XbaI+NdeI	diese Arbeit
pDAK64	1172 XbaI/PstI-Fragment aus pDAK61 mit <i>terminator-nrs</i> 'C in pDAK62/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK65	2788 bp-XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK64 mit P_{nrsB} - <i>strep-eyfp-terminator-nrs</i> 'C in pLO3/XbaI	diese Arbeit
pDAK66	phosphoryliertes 1654 bp-PCR-Produkt ka77/ka78 mit <i>nrsSR</i> '(<i>Syn</i> 6803) in LITMUS29/EcoRV	diese Arbeit
pDAK67	759 bp-NheI-Fragment aus pDAK28 mit P_{nrsB} in pDAK66/NheI	diese Arbeit
pDAK68	phosphoryliertes 2197 bp-PCR-Produkt ka79/ka80 mit <i>nrs</i> 'CD(<i>Syn</i> 6803) in LITMUS29/EcoRV	diese Arbeit
pDAK69	2197 bp-ClaI/SpeI-Fragment aus pDAK68 mit <i>nrs</i> 'CD in pDAK61/SpeI+ClaI	diese Arbeit
pDAK70	1172 XbaI/PstI-Fragment aus pDAK61 mit <i>terminator-nrs</i> 'C in pDAK52/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK71	7695 bp-XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK70 mit P_{nrsB} - <i>strep-hoxFUYHWI-terminator-nrs</i> 'C in pLO3/XbaI	diese Arbeit
pDAK72o1	938 bp-XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK63 mit P_{psbAll} - <i>strep-eyfp</i> in pVZ321/XbaI (Expressionkassette <i>upstream</i> von Cm^R)	diese Arbeit

pDAK81	151 bp-XbaI/PstI-Fragment aus BBa_B0015 mit <i>terminator</i> in pDAK38/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK82	151 bp-XbaI/PstI-Fragment aus BBa_B0015 mit <i>terminator</i> in pDAK39/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK83	151 bp-XbaI/PstI-Fragment aus BBa_B0015 mit <i>terminator</i> in pDAK40/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK84	151 bp-XbaI/PstI-Fragment aus BBa_B0015 mit <i>terminator</i> in pDAK63/SpeI+SbfI	diese Arbeit
pDAK85o1	XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK81 mit P _{psbAII-strep-hoxFUYHWHypA2B2F2CDEX-terminator} in pVZ321/XbaI (Expressionkassette <i>upstream</i> von Cm ^R)	diese Arbeit
pDAK85o2	XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK81 mit P _{psbAII-strep-hoxFUYHWHypA2B2F2CDEX-terminator} in pVZ321/XbaI (Expressionkassette <i>downstream</i> von Cm ^R)	diese Arbeit
pDAK86o1	XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK84 mit P _{psbAII-strep-eyfp-terminator} in pVZ321/XbaI (Expressionkassette <i>upstream</i> von Cm ^R)	diese Arbeit
pDAK86o2	XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK84 mit P _{psbAII-strep-eyfp-terminator} in pVZ321/XbaI (Expressionkassette <i>downstream</i> von Cm ^R)	diese Arbeit
pDAK54	phosphoryliertes 3420 bp-PCR-Produkt ka66/ka67/ka68 mit EcoRV/2-Spec ^R -EcoRV- <i>sacB</i> in LITMUS28/EcoRV (<i>sacB</i> in <i>antisense</i> zu Amp ^R)	diese Arbeit
pDAK56	1028 bp-PCR-Produkt ka69/ka70 mit SpeI-upstream-Fragment von <i>hoxH</i> (Syn6803)-BsiWI in LITMUS28/SnaBI+StuI	diese Arbeit
pDAK57	1014 bp-PCR-Produkt ka71/ka72 mit XbaI-downstream-Fragment von <i>hoxE</i> (Syn6803)-SacI in LITMUS28/SnaBI+StuI	diese Arbeit
pDAK58	1022 bp-SpeI/BsiWI-Fragment aus pDAK56 mit upstream-Fragment von <i>hoxH</i> (Syn6803) in pDAK54/SpeI+BsiWI	diese Arbeit
pDAK59	1008 bp-XbaI/SacI-Fragment aus pDAK57 mit downstream-Fragment von <i>hoxE</i> (Syn6803) in pDAK58/XbaI+SacI	diese Arbeit
pB-BioY-mCer-Sm	Spec ^R	Finkenwirth <i>et al.</i> , 2010
pQE60	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , P _{T5-lacO} -MCS(NcoI/BamHI/BglII)- <i>his6</i> _{Stop}	Qiagen
pHELP1	phosphoryliertes 365 bp PCR-Produkt ka1/ka2 mit <i>petJ</i> _{ΔStop} aus Syn6803 in LITMUS28/EcoRV	diese Arbeit
pDAK1	362 bp-PciI/BglII-Fragment aus pHELP1 mit <i>petJ</i> _{ΔStop} aus Syn6803 in pQE60/NcoI+BglII	diese Arbeit
pCH675-pelB-Rp-HF	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> fl(+) <i>ori</i> (pBlueSkript-KS(+)-Derivat), P _{lac-pelB-leader} (<i>E. coli</i>)- <i>his10-RpNiCoT-Gen</i> (AflIII/BglII) - <i>flag</i>	P. Hebbeln, 2008
pDAK3	258 bp-PCR-Produkt ka3/ka2 mit leader-freiem <i>petJ</i> _{ΔStop} aus Syn6803/NcoI+BglII in pCH675-pelB-Rp-HF/AflIII+BglII	diese Arbeit
pEC86	Cm ^R , p15A <i>ori</i> , P _{tet-ccmA-H} aus <i>E. coli</i> (cytochrom c Maturationsfaktoren)	erhalten von G. Sawers (MLU Halle)/Arslan <i>et al.</i> , 1998
pCH1617	936 bp-AgeI/SacI-Fragment aus #2904 mit <i>hox'UV'</i> in LITMUS29/AgeI/+SacI	diese Arbeit
pCH1618	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{H12E}	diese Arbeit
pCH1619	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{H199E}	diese Arbeit
pCH1620	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{H153E}	diese Arbeit
pCH1621	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C39G}	diese Arbeit
pCH1622	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C79V}	diese Arbeit
pCH1623	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C104S}	diese Arbeit
pCH1624	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C131V}	diese Arbeit
pCH1625	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C166V}	diese Arbeit
pCH1626	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C39A}	diese Arbeit
pCH1627	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C39S}	diese Arbeit

pCH1628	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C41G}	diese Arbeit
pCH1629	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C141S}	diese Arbeit
pCH1630	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C44G}	diese Arbeit
pCH1631	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C44S}	diese Arbeit
pCH1632	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C113G}	diese Arbeit
pCH1633	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C113S}	diese Arbeit
pCH1634	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C179G}	diese Arbeit
pCH1635	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C179S}	diese Arbeit
pCH1643	pCH1617-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{W42S}	M. Grunzel, 2012
pCH1648	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1643 mit <i>hox'UY</i> ^{W42S} in pLO3/SacI+PstI	M. Grunzel, 2012
pCH1655	969 bp-PshAI/Ecl136II-Fragment aus #2904 mit 5'-UTR _{hoxF} - <i>strep-hoxF</i> in pLO3/PmeI	diese Arbeit
pCH1656	1068 bp-StuI/SnaBI-Fragment aus pCH1618 mit <i>hox'UY</i> ^{H12E} in pLO3/PmeI	diese Arbeit
pCH1657	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1619 mit <i>hox'UY</i> ^{H199E} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1658	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1620 mit <i>hox'UY</i> ^{H153E} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1659	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1621 mit <i>hox'UY</i> ^{C39G} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1660	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1622 mit <i>hox'UY</i> ^{C79V} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1661	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1623 mit <i>hox'UY</i> ^{C104S} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1662	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1624 mit <i>hox'UY</i> ^{C131V} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1663	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1625 mit <i>hox'UY</i> ^{C166V} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1664	990 bp- <i>overlapping</i> PCR-Produkt (ka28/ka29)/(ka30/ka31) mit <i>hoxY</i> ^{Nqo6} (codiert HoxY(A39CCAIMMAST49) in welchem das HoxY(C39GCWGCTLSFL49)-Motiv durch das entsprechende Motiv aus Nqo6 von <i>Thermus thermophilus</i> ersetzt wurde)/SacI+PstI in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1665	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1626 mit <i>hox'UY</i> ^{C39A} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1666	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1627 mit <i>hox'UY</i> ^{C39S} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1667	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1628 mit <i>hox'UY</i> ^{C41G} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1668	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1629 mit <i>hox'UY</i> ^{C41S} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1669	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1630 mit <i>hox'UY</i> ^{C44G} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1670	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1631 mit <i>hox'UY</i> ^{C44S} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1671	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1632 mit <i>hox'UY</i> ^{C113G} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1672	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1633 mit <i>hox'UY</i> ^{C113S} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1673	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1634 mit <i>hox'UY</i> ^{C179G} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH1674	978 bp-SacI/PstI-Fragment aus pCH1635 mit <i>hox'UY</i> ^{C179S} in pLO3/SacI+PstI	diese Arbeit
pCH751	Amp ^R , Km ^R , p15A <i>ori</i> , 4604 bp Fragment mit NdeI- <i>hoxFUYH'</i> aus RoMR11	Porthun <i>et al.</i> , 2002

pCH758	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , P _{SH} (ReH16)- <i>hoxFUYHWT'</i> (RoMR11)- <i>hypA2B2F2</i> (ReH16)	Porthun <i>et al.</i> , 2002
pEDY309	Tet ^R , RK2 <i>ori</i> , Mob ⁺ , MCS(SwaI-ScaI-KpnI-XbaI-BglII-HindIII-SfuI-SpeI-ClaI):: <i>lacZ'</i>	Kleihues <i>et al.</i> , 2000
pGE442	pEDY309-Derivat mit P _{SH} (ReH16)- <i>hoxFUYHWT'</i> (RoMR11)- <i>hypA2B2F2</i> (ReH16)	Porthun <i>et al.</i> , 2002
pGE552	pEDY309-Derivat mit P _{SH} - <i>strep-hoxFUYHWT</i> <i>hypA2B2F2</i> (ReH16)	T. Burgdorf/ (unveröffentlicht)
#3001	pEDY309-Derivat mit P _{SH} - <i>hoxFUYHWT</i> <i>hypA2B2F2-hypCDEFXhoxA</i> (ReH16)	J. Hamann/O. Lenz (unveröffentlicht)
#5238	Tet ^R , RK2 <i>ori</i> , Mob ⁺ (pCM62-Derivat), SpeI/XbaI-P _{SH} -NcoI-BglII- <i>strep</i> _{Stop} -HindIII-XbaI/SpeI	J. Hamann/O. Lenz (unveröffentlicht)
pDAK90b	256 bp-XhoI-Fragment von pCH758 mit ' <i>hoxF</i> ' aus RoMR11 im 3110 bp-XhoI-Fragment von #2904 mit P _{SH} - <i>strep-hoxF</i> ' aus ReH16	diese Arbeit
pDAK91b	470 bp-ScaI/AflIII-Fragment aus pDAK90b mit P _{SH} (ReH16)- <i>strep-hoxF</i> '(ReH16/RoMR11 Hybrid) und 9000 bp-ScaI/SpeI-Fragment aus pCH758 mit ' <i>hoxFUYHWT'</i> (RoMR11)- <i>hypA2B2F2</i> (ReH16) in LITMUS29/AflIII +SpeI	diese Arbeit
pDAK93	9707 bp-HpaI/SpeI-Fragment aus pDAK91b mit P _{SH} - <i>strep-hoxF</i> '(ReH16)-' <i>hoxFUYHWT'</i> (RoMR11)- <i>hypA2B2F2</i> (ReH16) in pEDY309/SpeI+ScaI	diese Arbeit
pDAK94	7186 bp-HpaI/FseI-Fragment aus pDAK91b mit P _{SH} - <i>strep-hoxF</i> '(ReH16)-' <i>hoxFUYHWT'</i> (RoMR11)- <i>hypA2B2</i> '(ReH16) in #3001/FseI+ScaI mit <i>hyp</i> 'B2F2CDEX(ReH16)	diese Arbeit
pDAK109	2569 bp-PCR-Produkt ka96/ka97 mit <i>strep-hoxFU</i> (RoMR11)/NcoI+BamHI in #5238/NcoI+BglII	diese Arbeit
pDAK110	2643 bp-PCR-Produkt ka98/ka102 mit <i>strep-hoxYHW</i> (RoMR11)/NcoI+BglII in #5238/NcoI+BglII	diese Arbeit
pDAK111	662 bp-NcoI/ClaI-Fragment aus pDAK109 mit <i>strep-hoxF</i> '(RoMR11) und 1944 bp-ClaI/BamHI-Fragment aus pCH758 mit ' <i>hoxFUY</i> ' (RoMR11) in pDAK110/NcoI+BamHI mit ' <i>hoxYHW</i> ' (RoMR11)	diese Arbeit
pDAK113o1	2914 bp-SpeI-Fragment aus pDAK109 mit P _{SH} - <i>strep-hoxFU</i> '(RoMR11) in pEDY309/XbaI (Tet ^R <i>downstream</i> der Expressionskassette und <i>in sense</i>)	J. Hamann für diese Arbeit
pDAK113o2	2914 bp-SpeI-Fragment aus pDAK109 mit P _{SH} - <i>strep-hoxFU</i> (RoMR11) in pEDY309/XbaI (Tet ^R <i>upstream</i> der Expressionskassette und <i>in antisense</i>)	J. Hamann für diese Arbeit
pDAK114o1	3000 bp-SpeI-Fragment aus pDAK110 mit P _{SH} - <i>strep-hoxYHW</i> (RoMR11) in pEDY309/XbaI (Tet ^R <i>downstream</i> der Expressionskassette und <i>in sense</i>)	J. Hamann für diese Arbeit
pDAK115o1	5512 bp-SpeI-Fragment aus pDAK111 mit P _{SH} - <i>strep-hoxFUYHW</i> (RoMR11) in pEDY309/XbaI (Tet ^R <i>downstream</i> der Expressionskassette und <i>in sense</i>)	J. Hamann für diese Arbeit
pDAK115o2	5512 bp-SpeI-Fragment aus pDAK111 mit P _{SH} - <i>strep-hoxFUYHW</i> (RoMR11) in pEDY309/XbaI (Tet ^R <i>upstream</i> der Expressionskassette und <i>in antisense</i>)	J. Hamann für diese Arbeit

Tab. 2 Bakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Konstruktion	Herkunft /Referenz
<i>Escherichia coli</i>			
JM109	<i>recA1 endA1 supE44 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) relA1 Δ(lac-proAB) e14⁻ mcrB⁺ F⁺[traD36 proAB⁺ lac^q lacZΔM15]</i>		Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
XL1-blue	Tet ^R , <i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 lac F⁺[proAB lac^q lacZΔM15 ::Tn10]</i>		Stratagene
NEB10-beta	<i>recA1 endA1 fhuA lacX74 araD139, Δ(ara,leu)7697 lacZΔM15 galE15 galK16 nupG rpsL::Strep^R mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), F⁺</i>		New England Biolabs
S17-1	Strep ^R , Tet ^R , <i>recA1 pro thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i> ; RP4-2 <i>tra</i> -Gene chromosomal integriert		Simon <i>et al.</i> , 1983
J53 (RP4)	Tet ^R , <i>met pro</i> , F ⁺ , trägt RP4-Plasmid		Clowes und Rowley, 1954
BL21 (DE3)	Tet ^R , <i>endA gal hsdS(r_B⁻ m_B⁻) lon ompT dcm⁺, F⁻, λ(DE3[lacI^q lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]); codiert T7-RNA-Polymerase</i>		Stratagene
<i>Ralstonia eutropha</i> H16			
H16	<i>wild-type</i>		
HF210	pHG1 ⁻ (Megaplasmid auf dem u.a. alle Hydrogenase-relevanten Gene codiert sind)		Kortlücke und Friedrich, 1992
HF782	HF210 mit pGE617-Derivat; Produktionsstamm für SH-Derivat mit <i>Strep</i> -HoxY		A. Schwarze, 2010
HF783	HF210 mit pGE617-Derivat; Produktionsstamm für SH-Derivat mit <i>Strep</i> -PsaD _{ΔClamp} -HoxY		A. Schwarze, 2010
HF784	HF210 mit pGE617-Derivat; Produktionsstamm für SH-Derivat mit <i>Strep</i> -PsaE-HoxY		A. Schwarze, 2010
HF785	HF210 mit pGE617-Derivat; Produktionsstamm für SH-Derivat mit <i>Strep</i> -PetF-HoxY		A. Schwarze, 2010
HF869	<i>ΔhoxG ΔhoxC ΔhofG</i>		Casper Schäfer (unveröffentlicht)
HF1009	<i>ΔhoxG ΔhoxC ΔhofG strep-hoxF (hoxY^{WT})</i>	HF869 x S17-1 (pCH1655)	diese Arbeit
HF1010	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{H12E}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1656)	diese Arbeit
HF1011	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{H99E}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1657)	diese Arbeit
HF1012	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{H153E}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1658)	diese Arbeit
HF1013	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{C39G}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1659)	diese Arbeit
HF1014	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{C79V}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1660)	diese Arbeit
HF1015	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{C104S}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1661)	diese Arbeit
HF1016	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{C131V}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1662)	diese Arbeit
HF1017	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{C166V}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1663)	diese Arbeit
HF1018	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{Nqo6}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1664)	diese Arbeit
HF1019	HF1009-Derivat mit <i>hoxY^{C39A}</i>	HF1009x S17-1 (pCH1665)	diese Arbeit

HF1020	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C39S}	HF1009x S17-1 (pCH1666)	diese Arbeit
HF1021	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C41G}	HF1009x S17-1 (pCH1667)	diese Arbeit
HF1022	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C41S}	HF1009x S17-1 (pCH1668)	diese Arbeit
HF1023	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C44G}	HF1009x S17-1 (pCH1669)	diese Arbeit
HF1024	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C44S}	HF1009x S17-1 (pCH1670)	diese Arbeit
HF1025	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C113G}	HF1009x S17-1 (pCH1671)	diese Arbeit
HF1026	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C113S}	HF1009x S17-1 (pCH1672)	diese Arbeit
HF1027	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C179G}	HF1009x S17-1 (pCH1673)	diese Arbeit
HF1028	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{C179S}	HF1009x S17-1 (pCH1674)	diese Arbeit
HF1030	HF1009-Derivat mit <i>hoxY</i> ^{W42S}	HF1009x S17-1 (pCH1648)	M. Grunzel, 2012
HF369	pHG1 ⁺ , Δ <i>hoxG</i>		Bernhard <i>et al.</i> , 1996
HF424	pHG1 ⁺ , Δ <i>hoxG</i> Δ <i>hoxFUYHW</i> '		Massanz <i>et al.</i> , 1998
HF1054	pHG1 ⁺ , Δ <i>hoxG</i> Δ <i>hoxFUYHW</i> ' Δ <i>hoxI</i> (Deletion von 330 bp zwischen NarI und MroI)	HF424x AK877(S17-1/pCH513)	J. Hamann/ K. Karstens/ L. Lauterbach (unveröffentlicht)
<u><i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</u>			
WT	<i>wild-type</i>		AG Lockau, HU Berlin/ PCC-M Trautmann <i>et al.</i> , 2012
Δ <i>hoxH</i>	Δ <i>hoxH</i> ::Km ^R (Hydrogenase ⁻)		AG Schulz/ Appel, CAU Kiel/ Appel <i>et al.</i> , 2000
SD102	Δ <i>nrsBAC</i> ::(P _{nrsB} - <i>holin13</i> -Km ^R - <i>sacB</i>)		Liu und Curtiss, 2009/ R. Curtiss III, ASU Arizona
Δ <i>hox59a</i>	Δ <i>hoxEF3UH67Y</i> ::(Spec ^R - <i>sacB</i>) (Hydrogenase ⁻)	WT/pDAK59	diese Arbeit
Δ <i>psaE</i> PSI-His	<i>his10-psaF</i> ::Cm ^R , Δ <i>psaE</i> ::Spec ^R		Schwarze <i>et al.</i> , 2010
WT PSI-His	<i>his10-psaF</i> ::Cm ^R		Schwarze <i>et al.</i> , 2010
Δ <i>psaD</i>	Δ <i>psaD</i> ::Km ^R		B. Lagoutte, CE de Saclay
<u><i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002</u>			
WT	<i>wild-type</i>		AG Lockau, HU Berlin
<u><i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942</u>			
WT	<i>wild-type</i>		AG Lockau, HU Berlin

2.2 Medien und Anzuchsbedingungen

2.2.1 Nährmedien und Antibiotika

Die Zusammensetzung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien ist Tab. 3 zu entnehmen. Für die Herstellung von festen Komplexmedien wurde 1,5 % (w/v) Agar-Agar (Roth) zugegeben. Festes Mineralmedium enthielt 1,5 % (w/v) Reinst-Agar (Difco Bacto™ Agar). Festem BG11- bzw. A⁺-Medium wurde zusätzlich 0,3 % (w/v) Natriumthiosulfat zugesetzt. In Tab. 4 sind die eingesetzten Antibiotika und ihre Dosierung aufgeführt.

Tab. 3 Nährmedien

finale Konzentration im Medium	
LB	
Bacto Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
LSLB	
Bacto Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,25 % (w/v)
LB-Sac	
LSLB	
Saccharose	20 % (w/v)
LB-Psi	
LB	
MgSO ₄	4 mM
KCl	10 mM
TB (Terrific Broth)	
Hefeextrakt	2,4 % (w/v)
Bacto Trypton	1,2 % (w/v)
Glycerin	0,4 % (v/v)
K ₂ HPO ₄	0,3 % (w/v)
KH ₂ PO ₄	1,2 % (w/v)
NB	
Nutrient Broth	0,8 % (w/v)
Aut (Mineralmedium für lithoautotrophes Wachstum von <i>R. eutropha</i>)	
- Fortsetzung nächste Seite	
H16-Puffer pH 7,0 (10x)	10 % (v/v)
9 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	25,1 mM
1,5 % (w/v) KH ₂ PO ₄	11 mM
Magnesiumsulfat-Stammlösung*	0,1 % (v/v)
20 % (w/v) MgSO ₄	810 µM
Calciumchlorid-Stammlösung*	0,1 % (v/v)
1 % (w/v) CaCl ₂ x 2 H ₂ O	68 µM
Eisenchlorid-Stammlösung (sterilfiltriert)*	0,1-0,2 % (v/v)
0,5 % (w/v) FeCl ₃ x 6 H ₂ O in 0,1 N HCl	18,4-36,8 µM
Nickelchlorid-Stammlösung*	0,1 % (v/v)
1 mM NiCl ₂ x 6 H ₂ O	1 µM

Zinkchlorid-Stammlösung*	0,1 % (v/v) (für SH-exprimierende Stämme)	
1 mM ZnCl ₂		1 µM
Spurenelementlösung 10xSL6-Ni ²⁺ (sterilfiltriert)*	0,1 % (v/v) (für SH-exprimierende Stämme)	
0,01 % (w/v) ZnSO ₄ x 7 H ₂ O		0,35 µM
0,003 % (w/v) MnCl ₂ x 4 H ₂ O		0,15 µM
0,03 % (w/v) HBO ₃		4,85 µM
0,02 % (w/v) CoCl ₂ x 6 H ₂ O		0,84 µM
0,001 % (w/v) CuCl ₂ x 2 H ₂ O		0,06 µM
0,003 % (w/v) NaMoO ₄ x 2 H ₂ O		0,12 µM
Ammoniumchlorid-Stammlösung*	1 % (v/v)	
20 % (w/v) NH ₄ Cl		37,4 mM
FN (Mineralmedium für heterotrophes Wachstum auf Fruktose)		
Aut-Medium		
Fruktose-Stammlösung (sterilfiltriert)*	1 % (v/v)	
40 % (w/v) Fruktose		0,4 % (w/v)
F_{0,05}G_{0,4}N (Mineralmedium für biphasisches Wachstum auf Fruktose und Glycerin)		
Aut-Medium		
Fruktose-Stammlösung (sterilfiltriert)*	0,125 % (v/v)	
40 % (w/v) Fruktose		0,05 % (w/v)
Glycerin-Stammlösung*	1 % (v/v)	
40 % (w/v) Glycerin		0,4 % (w/v)
BG11**		
preBG11 (100x) (sterilfiltriert/verdünnt autoklavierbar)	1 % (v/v)	
0,75 % (w/v) MgSO ₄ x 7 H ₂ O		0,3 mM
0,36 % (w/v) CaCl ₂ x 2 H ₂ O		0,24 mM
0,06 % (w/v) Zitronensäure		0,03 mM
14,96 % (w/v) NaNO ₃		17,6 mM
0,14 % (v/v) Na ₂ EDTA		
0,2 M Stammlösung Na ₂ EDTA pH 8.0		2,8 µM
10 % (v/v) Spurenelementlösung (sterilfiltriert)		
0,0022 % (w/v) ZnSO ₄ x 7 H ₂ O		0,77 µM
0,18 % (w/v) MnCl ₂ x 4 H ₂ O		9,15 µM
0,286 % (w/v) HBO ₃		46,30 µM
0,0049 % (w/v) Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O		0,17 µM
0,0079 % (w/v) CuSO ₄ x 5 H ₂ O (nicht in BG11–Cu2+)		0,32 µM
0,039 % (w/v) NaMoO ₄ x 2 H ₂ O		1,61 µM
HEPES-Pufferlösung	1 % (v/v)	
1 M HEPES		10 mM
TES	0,23 % (w/v)	
		10 mM
Natriumcarbonat-Stammlösung	0,1 % (v/v)	
2 % (w/v) Na ₂ CO ₃		0,19 mM
Dikaliumhydrogenphosphat-Stammlösung	0,1 % (v/v)	
3 % (w/v) K ₂ HPO ₄		0,17 mM
Eisen-III-Stammlösung (sterilfiltriert)*	0,1 % (v/v)	
6 % (w/v) Ammoniumeisen(III)-citrat		22 µM
BG11-Sac		
BG11 (-12,5 % (v/v) H ₂ O)		
Saccharose-Stammlösung (sterilfiltriert)*	12,5 % (v/v)	
40 % (w/v) Saccharose		5 % (w/v)

BG11-LB		
BG11 LB*	5 % (v/v)	
A⁺ (Mineralmedium für die Kultivierung von <i>Synechococcus</i> PCC 7002)		
NaCl	1,8 % (w/v)	308 mM
KCl	0,06 % (w/v)	8 mM
NaNO ₃	0,1 % (w/v)	11,8 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 % (w/v)	10 mM
KH ₂ PO ₄	0,005 % (w/v)	36,7 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,027 % (w/v)	39,2 mM
Na ₂ EDTA	0,003 % (w/v)	80,6 µM
Eisenchlorid-Stammlösung (sterilfiltriert) 0,5 % (w/v) FeCl ₃ x 6 H ₂ O in 0,1 N HCl	0,078 % (v/v)	14,4 µM
Tris-Puffer (100x) 10 % (w/v) Tris-HCl (pH 8,2)	1 % (v/v)	8,3 mM
P1 Spurenelementlösung (sterilfiltriert)	0,1 % (v/v)	
0,01 % (w/v) ZnSO ₄ x 7 H ₂ O		3,1 µM
0,432 % (w/v) MnCl ₂ x 4 H ₂ O		21,8 µM
3,426 % (w/v) HBO ₃		554 µM
0,02 % (w/v) CoCl ₂ x 6 H ₂ O		0,051 µM
0,001 % (w/v) CuCl ₂ x 2 H ₂ O		0,012 µM
0,003 % (w/v) NaMoO ₄ x 2 H ₂ O		0,18 µM
Vitamin B12 (sterilfiltriert)* 4 mg/l Cobalamin (Vitamin B12)	0,1 % (v/v)	2,53 nM

* Komponenten wurden unabhängig von der Stammlösung sterilisiert und dieser nach dem Autoklavieren zugesetzt.

** Der pH-Wert des BG11-Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH 8,0 eingestellt.

Tab. 4 Antibiotika

Antibiotikum	Ampicillin	Kanamycin	Chloramphenicol	Tetracyclin	Spectinomycin	Streptomycin	Genatmicin
Konzentration der Stammlösung [mg ml ⁻¹]	100*	100*	30**	10**	100*	50*	100*
Selektionskonzentration [µg ml ⁻¹] für							
<i>E. coli</i>	100	25-100	30	20		50	
<i>R. eutropha</i>		350		15			
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		100	30		30		
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002		100	10		50	50	25
<i>S. elongatus</i> PCC 7942		20	12		20		

* in Millipore-H₂O

** in 70 % (v/v) Ethanol

2.2.2 Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Standardmäßig wurden *E. coli*-Kulturen bei 37 °C in LB oder LSLB (Tab. 3) unter Einsatz geeigneter Antibiotika (Tab. 4) angezogen. Die Kulturen im 10-20 ml bzw. im 3-5 ml Maßstab wurden in 100 ml-Kölbchen bzw. Glasröhrchen bei 180-220 rpm inkubiert. Für die heterologe Produktion des Cytochrom *c*₆ aus *Synechocystis* in *E. coli* (siehe auch 2.5.1) wurde eine über Nacht in LB mit 30 µg ml⁻¹ Chloramphenicol und 100 µg ml⁻¹ Ampicillin dichtgewachsene Kultur des entsprechenden Stamms (BL21(DE3)/ pEC86 + pDAK3) 1:100 in TB oder LB mit Antibiotika (Tab. 3) überimpft. Standardmäßig wurden die Hauptkulturen in einem mit 0,9 l Medium gefüllten 2 l-Schikanekolben angesetzt und zunächst bei 37 °C schüttelnd (220 rpm) inkubiert. Nach 2-3 h bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression des Cytochroms *c*₆ durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und die Produktion und Reifung des Proteins durch 40-stündige Inkubation bei 30 °C unter mikroaeroben Bedingungen (80 rpm) forciert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C (Sorvall RC6+ Centrifuge, Thermo Scientific) geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Reinigung des Proteins bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Anzucht von *R. eutropha*-Kulturen

Für genetische Arbeiten wurden *R. eutropha*-Kulturen in LSLB-, NB- oder FN (Tab. 3) bei 37 °C angezogen. Vorkulturen für die heterologe Produktion von SH-Derivaten wurden in FN-Medium gut belüftet für 30-48 h bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkulturen wurden wie bei Fritsch *et al.*, 2011a beschrieben in zu 80 % (v/v) mit F_{0,05}G_{0,4}N-Medium-gefüllten Schikanekolben bei 30 °C und 120 rpm angezogen. Für die SH-Produktion wurde das Medium zusätzlich mit 1 mM ZnCl₂, 0,1 % (v/v) Spurenelementlösung 10xSL6 ohne Ni²⁺ (nach Pfennig, 1974) und der doppelten Menge an FeCl₃-Lösung versetzt. Nach 6-13 Tagen bei einer OD₄₃₆ von 10-12 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C (Sorvall RC6+ Centrifuge, Thermo Scientific) geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert. Für die chemolithoautotrophen Wachstumsversuchen wurden die frisch unter Hydrogenase-reprimierenden Bedingungen (FN, 37 °C) gewachsenen Stämme auf Aut-Platten (Tab. 3) ausgestrichen und in Begasungstöpfen mit einer definierten Atmosphäre aus 3 % (v/v) H₂, 10 % (v/v) CO₂, x % (v/v) O₂, 87-x % (v/v) N₂ bei 30 °C inkubiert.

2.2.4 Anzucht cyanobakterieller Kulturen

Synechocystis und *S. elongatus* wurden in BG11-Medium (Tab. 3) gegebenenfalls unter Einsatz von geeigneten Antibiotika (Tab. 4) angezogen. Für die Anzucht des euryhalinen Cyanobakteriums *Synechococcus* PCC 7002 wurde A⁺-Medium (Tab. 3) mit den entsprechenden Antibiotika (Tab. 4) verwendet. Kulturen auf Nähragarplatten wurden bei 30 °C unter dem Licht von zwei Leuchtstofflampen (OSRAM DULUX S 11W/21-840) bei 10-30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert. Um einem Austrocknen der Platten entgegenzuwirken wurden diese in geschlossene Glas- oder Polypropylen-Schalen gelegt. Flüssigkulturen wurden in maximal zu 40 % (v/v)-gefüllten Schüttelkolben bei 28-30 °C in mit Beleuchtungselementen ausgestatteten Schüttelinkubatoren (innova[®] 4230 REFIGERATED INCUBATOR SHAKER und innova[®] 43 INCUBATOR SHAKER SERIES, beide New Brunswick scientific, Edison NJ, USA) angezogen. Für die Produktion der PSI-Derivate wurden die entsprechenden *Synechocystis*-Stämme im Photobioreaktor (Kultivationssystem phototropher Mikroorganismen –LWS-05-, IGV GmbH, Nuthetal, Deutschland) kultiviert. Hierzu wurden die 1,8 l-großen Säulenreaktoren steril mit 1,5 l BG11-Medium und den entsprechenden Antibiotika befüllt und mit 200 ml der im Schikanekolben gewachsenen Vorkultur beimpft. Über den Doppelmantel des Säulenbioreaktors erfolgte eine Temperierung auf 28 °C. Die Kultur wurde mit einem Druckluftstrom von 5-10 Nl h^{-1} begast und zusätzlich mit einem auf 350 rpm eingestellten Magnetrührer durchmischt. Die Beleuchtung erfolgte über eine parallel zu den Photobioreaktorsäulen aufgestellte Beleuchtungseinheit, die auf 30-35 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eingestellt wurde. Nach 6 bis 10 Tagen bei einer OD₇₅₀ von 1-2,5 wurden die Kulturen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung der PSI-Komplexe bei -80°C gelagert. Die Emissionsspektren der hier aufgeführten Lichtquellen sind im Anhang dieser Arbeit (Abb. S1) abgebildet.

2.3 Allgemeine Techniken zum Arbeiten mit DNA

2.3.1 Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop[®]

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und zur Überprüfung des Reinheitsgrads wurden Absorptionsspektren von DNA-Lösungen im Bereich von 220 bis 350 nm mit dem Spektrophotometer (NanoDrop[®] ND-1000) aufgenommen. Aus der Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) wurde die DNA-Konzentration berechnet. Hierfür wurde ein Extinktionskoeffizient von 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für doppelsträngige DNA verwendet. Der Quotient der Absorptionen bei 260

und 280 nm (A_{260}/A_{280}) wurde außerdem als Indikator für mögliche Verunreinigungen der Probe mit Proteinen verwendet. Ab einem Wert von 1,8 wurden die Proben als reine DNA betrachtet.

2.3.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gel-Elektrophorese

Für die Identifikation und Isolation von DNA-Fragmenten wurden diese gelelektrophoretisch in 0,8–2 % (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer sowie für die Präparation der Agarosegele wurde in dieser Arbeit TPE-Puffer (80 mM TrisHCl (pH 7,6) eingestellt mit 85 % (w/v) Phosphorsäure, 8 mM EDTA) verwendet. Die mit 20–40 % (v/v) *Schwerer Lösung* (20 % (w/v) Ficoll 400 in H₂O; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau) versetzten Proben wurden neben einem Größenstandard (2-log DNA Ladder, NEB) auf die Agarosegele aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 90 V an die Gel-Elektrophoreseapparatur (Werkstätten FU Berlin) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente. Die Visualisierung der DNA wurde durch Färbung des Agarosegels mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, z. B. Roti[®]-SafeGelStain (Roth) oder GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium), ermöglicht. Die DNA-Farbstoffkomplexe wurden mit UV-Licht (302 oder 365 nm) angeregt und konnten mit der Gel-Dokumentationsanlage (MultiImage[®] Light Cabinet, AlphaInnotech) bzw. unter Verwendung einer geeigneten Schutzbrille mit den eigenen Augen detektiert werden. Für präparative Zwecke wurden die gewünschte DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen) isoliert.

2.3.3 Enzymatische Modifikation von DNA-Fragmenten

Die zur Klonierung neuer Konstrukte und für die analytische Überprüfung von DNA-Fragmenten notwendigen, enzymatischen Modifikationen von DNA-Fragmenten, d. h. Restriktionsverdaus, 5'-Phosphorylierungen, 5'-Dephosphorylierungen und Ligationen, wurden mit Enzymen der Hersteller NEB, Fermentas und Promega durchgeführt. Die Versuchsbedingungen entsprachen jeweils dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (siehe Tab. S1) DNA-Bereiche amplifiziert. Für die Überprüfung von Allelen in Stämmen und Klonen wurde hierfür die LongAmp[®] Taq DNA Polymerase (NEB) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Als Template dienten in diesen Fälle in

der Regel 2 µl einer (gekochten) Zellsuspension (Zahnstocherspitze Zellmaterial in 200 µl Millipore®-H₂O). Für Proben aus *R. eutropha* oder Cyanobakterien war es in einigen Fällen notwendig die als Template verwendete genomische DNA zu reinigen (siehe 2.3.8). Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und reine DNA als Template verwendet. Eine gelegentlich notwendige Optimierung des vom Hersteller empfohlenen Standardprotokolls wurde durch Zugabe von 2-4 % (v/v) DMSO und/oder der Verwendung des *Touchdown*-Protokolls erreicht. Beim *Touchdown*-PCR-Protokoll wird die *Annealing*-Temperatur im ersten und zweiten Replikationszyklus 5 °C höher und im dritten und vierten Replikationszyklus 2 °C höher als die „idealen“ *Annealing*-Temperatur eingestellt. Diese wird dann ab dem fünften Replikationszyklus verwendet. Gezielte Punktmutationen wurden mittels Drei-Primer-PCR in den amplifizierten DNA-Bereich eingefügt. Hierbei wurde zunächst eine PCR mit einem die gewünschte Mutation codierenden, internen Primer und einem entgegengesetzt orientierten, äußeren Primer durchgeführt. Das aus dem Agarosegel isolierte Amplifikat dieser ersten PCR diente zusammen mit dem zweiten äußeren Primer als Matrize für eine zweite PCR deren Produkt das mutagenisierte DNA-Fragment darstellt. Relevante Bereiche der aus PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten hervorgegangenen Plasmide wurden sequenziert (SMB Service in Molecular Biology GmbH c/o Martin Meixner).

2.3.5 QuickChange Mutagenese

Zum gezielten Einfügen von Punktmutationen in bestehende Plasmide wurde in dieser Arbeit das QuickChange Protokoll (Stratagene, 2004) verwendet. Die hierfür entworfenen Oligonukleotide codieren den gewünschten Aminosäureaustausch im vorderen Drittel der Sequenz (Tab. S2). Gegebenenfalls durch Einfügen von zusätzlichen, stillen Mutationen wurde das veränderte Allel mit der Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Restriktionsschnittstelle gekennzeichnet. Die *forward* und *reverse* Primer wurden so ausgewählt, dass nur die die Mutationen enthaltenden 5'-Enden der Oligonukleotide komplementär sind (vgl. Zheng *et al.*, 2004). So sollte einer Hybridisierung der Primer in der Mutagenese-PCR entgegengewirkt werden. Für die Mutagenese-PCR hat sich in dieser Arbeit das folgende Protokoll bewährt:

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (50 µl):

31 µl	autoklaviertes Millipore®-H ₂ O
10 µl	5x Phusion HF Puffer (NEB)
1 µl	methyliertes Originalplasmid (~100 ng µl ⁻¹)
3 µl	<i>forward</i> Primer (10 µM)
3 µl	<i>reverse</i> Primer (10 µM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) (2 U µl ⁻¹)

Temperatur-Programm:

Initiale Denaturierung	120 s	95 °C
15 Zyklen:		
Denaturierung	30 s	95 °C
Primer Annealing	30 s	57 °C
Elongation	180 s	72 °C
Finale Elongation	300 s	72 °C

Das Produkt der PCR wurde mit 1 µl des Restriktionsenzym DpnI (NEB) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert um das nicht mutagenisierte, methylierte Ausgangsplasmid abzubauen. Im Anschluss wurde je 1 µl des Ansatzes in kompetente Zellen des *E. coli*-Stamms JM109 transformiert (2.3.6).

2.3.6 Transformation von Plasmiden in kompetente *E. coli*-Zellen

Isolierte Plasmide, Ligationsansätze und QuickChange-Mutagenese-Ansätze wurden durch Transformation in zuvor präparierte „kompetente“ *E. coli*-Zellen eingebracht. Dazu wurde in allen Schritten mit sterilen Gefäßen und Lösungen und wenn nötig an der Bunsenbrennerflamme gearbeitet. In dieser Arbeit wurde vorwiegend die Methode der Hitzeschocktransformation in chemisch-kompetente Zellen (wie beschrieben in Quiagen, 2003) verwendet. Zur Präparation der kompetenten Zellen wurde eine in 100 ml LB-Medium gewachsene *E. coli*-Kultur aus der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~0.5) auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation bei maximal 4000 x g und 4 °C sedimentiert. Die Zellen wurden in 30 ml eiskaltem TBF1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KCH₃COO, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin (pH 5,8) – steril filtriert) aufgenommen und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem TBF2-Puffer (10 mM MOPS-Puffer (pH 6,8 eingestellt mit KOH), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v)

Glycerin – steril filtriert) resuspendiert und auf Eis in 100 µl Portionen aliquotiert. Diese wurden direkt für die Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurden 50-100 µl der kompetente Zellen mit 50 ng reiner Plasmid-DNA, 10-20 µg Ligationsansatz bzw. 1 µl QuickChange-Mutagenese-Ansatz gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C im *Thriller* (peqlab). Im Anschluss wurden 900 ml LB-Psi (Tab. 3) ohne Antibiotika zu den Zellen gegeben und diese für 60 Minuten bei 30 °C schüttelnd inkubiert, um eine Expression des Antibiotikaresistenzgens in den erfolgreich transformierten Klonen zu ermöglichen. Abschließend wurden je 100 bis 500 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die aus Transformationen von Ligations- bzw. QuickChange-Mutagenese-Ansätzen hervorgegangenen Einzelkolonien wurden entweder durch PCR (2.3.4) oder durch Plasmidisolation (2.3.7) und Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids überprüft.

2.3.7 Plasmidisolation

Standardmäßig wurde Plasmid-DNA mit dem Protokoll von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) aus *E. coli*-Zellen isoliert. Dieses Protokoll basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen und einer anschließenden Ethanol-fällung der Plasmid-DNA. Für präparative Zwecke wurde Plasmid-DNA mit kommerziellen Plasmidisolutions-Kits entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei wurde die Plasmid-DNA über Anionenaustausch-Chromatographiesäulchen gereinigt. Für *High-copy* Plasmide wurde das *Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kit* (Invitex/ stratec) verwendet und für *Low-copy* Plasmide das *QIAGEN® Plasmid Midi Kit* (Qiagen).

2.3.8 Isolation genomischer DNA

Aus *R. eutropha*-Kulturen wurde genomische DNA mit dem Protokoll von Chen und Kuo (Chen und Kuo, 1993) gereinigt. Für die Isolation genomischer DNA aus cyanobakteriellen Proben wurde dieses Protokoll modifiziert. Zu der Zellen-Lysispuffer-Suspension wurde das äquivalente Volumen an Glasperlen (0,1-0,5 mm) gegeben und durch 10-minütiges Schütteln bei 30.000 Hz in der Zelmühle (Schwingmühle MM2 Retsch, Haan, Deutschland) die Zellen aufgeschlossen. Nach Sedimentation der Glasperlen durch Zentrifugation wurde mit dem Überstand wie im Originalprotokoll weitergearbeitet. Für eine bessere Handhabung wurde das Volumen der Ansätze im modifizierten Protokoll verdoppelt.

2.3.9 Konjugativer Plasmidtransfer in *R. eutropha* H16

Weitwirtsplasmide sowie mobilisierbare aber nicht in *R. eutropha* replizierende Suizidplasmide wurden durch Zwei-Elternkreuzung in *R. eutropha*-Stämme übertragen (Simon *et al.*, 1983). Als Donorstamm fungierte hierbei der die *tra*-Gene codierende, Thiamin- und Prolin-auxotrophe *E. coli*-Stamm S17-1, in den das zu transferierende Plasmid durch Transformation (2.3.6) eingebracht wurde. Je 500 µl der frischen, über Nacht gewachsenen Kulturen des Donor- und des Rezipientenstamms wurden auf einer NB-Agarplatte miteinander vermischt und für 6 bis 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Folgenden wurde das Zellmaterial in sterilem H16-Puffer (25,1 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 11 mM KH₂PO₄ (pH 7,0)) aufgenommen, einmal mit 5 ml H16-Puffer gewaschen und eine Verdünnungsreihe in H16-Puffer angelegt. Aliquotes der Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁵ bei Ansätze mit Weitwirtsplasmiden bzw. 1 bis 10⁻³ bei Ansätze mit Suizidplasmiden wurden auf selektivem Fruktose-Mineralmedium (FN) (Tab. 3) ausplattiert und für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Von Einzelkolonien wurden Reinheitsausstriche auf selektiven FN-Agarplatten angefertigt.

2.3.10 Erzeugung modifizierter *R. eutropha*-Stämme durch doppelt homologe Rekombination

Derivate des nicht in *R. eutropha* replizierenden Suizidplasmids pLO3 (Lenz und Friedrich, 1998) wurden verwendet um Allelaustausche in *R. eutropha*-Stämmen vorzunehmen. Durch homologe Bereiche von jeweils 300 bis 700 bp *upstream* und *downstream* des modifizierten DNA-Abschnitts wurde eine homologe Rekombination des Plasmids mit der DNA des Empfängerstamms ermöglicht. In einem ersten Schritt musste das Plasmid dazu durch Konjugation in den *R. eutropha*-Stamm übertragen werden (2.3.9). Durch Selektion auf Tetracyclin-haltigen FN-Agarplatten konnten dabei Klone isoliert werden, bei denen eine Integration der Plasmid-DNA ins Genom stattgefunden hatte. In einem zweiten Schritt wurde einer dieser Klone über Nacht ohne Selektionsdruck in NB-Medium kultiviert und Aliquotes der Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁴ dieser Kultur auf 20 % (w/v) Saccharose-enthaltenden LSLB-Agarplatten (Tab. 3) ausplattiert. Nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C wurden so Einzelkolonien von Klonen erhalten, in denen das Rückgrat des Vektors, auf welchem das *sacB*-Gen und die Tet^R-Kassette codiert sind, durch eine zweite homologe Rekombination wieder aus dem Genom entfernt worden war. Dies wurde durch ein Screening nach fehlender Tetracyclin-Resistenz überprüft. Abschließend wurden durch PCR (2.3.4) und

Restriktionsanalyse diejenigen Klone identifiziert, die das modifizierte und nicht das WT-Allel trugen.

2.3.11 Plasmidtransfer in Cyanobakterien

Mobilisierbare Plasmide wurden durch Konjugation in die cyanobakteriellen Spezies übertragen. Hierzu wurden vergleichend zwei Protokolle verwendet. Für die Zwei-Elternkreuzung basierend auf dem *E. coli*-Stamm S17-1 (vgl. 2.3.9) wurden eine 5 Stunden bei 37 °C in 20 ml LB gewachsene Kultur des Donorstamms (*E. coli* S17-1 mit dem zu transferierenden Plasmid) und eine 20 ml Kultur des cyanobakteriellen Rezipienten in der exponentiellen Wachstumsphase jeweils sedimentiert, in 5 ml H16-Puffer (25,1 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 11 mM KH₂PO₄ (pH 7,0)) bzw. BG11-Medium (Tab. 3) gewaschen und anschließend in 1 ml H16-Puffer bzw. 200 µl BG11-Medium aufgenommen. Je 200 µl der konzentrierten Zellsuspensionen des Donors und des Rezipients wurden auf BG11-LB-Agarplatten (Tab. 3) miteinander vermischt. Nach ein- bis zweitägiger Inkubation bei 30 °C unter Licht wurde das Zellmaterial in 5 ml BG11-Medium aufgenommen, in BG11-Medium gewaschen und eine Verdünnungsreihe angelegt. Aliquotes der Verdünnungsstufen 1 bis 10⁻² wurden auf BG11-Agarplatten mit halbmaximaler Antibiotikakonzentration (Tab. 4Tab. 4) ausplattiert. Nach 6-tägiger Inkubation bei 30 °C im Licht konnten Einzelkolonien auf BG11-Agar mit maximaler Antibiotikakonzentration übertragen werden. Für das Protokoll der Drei-Elternkreuzung wurden zunächst zwei 1:40 mit Übernachtskulturen beimpfte 10 ml LB-Kulturen des Helferstamms *E. coli* J53 (RP4) und des das zu transferierende Plasmidtragenden *E. coli*-Stamms XL1-Blue für 150 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, mit Antibiotika-freiem LB-Medium gewaschen und in 1 ml LB aufgenommen. Im Folgenden wurden die Zellsuspensionen der beiden Stämme vereinigt, sedimentiert, in 100 µl LB-Medium aufgenommen und für 90 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1,9 ml exponentiell wachsender, cyanobakterieller Kultur wurde die Zellsuspension wiederum sedimentiert, in 100 µl BG11-Medium aufgenommen und auf BG11-LB-Agar ausplattiert. Alle weiteren Schritte entsprachen denen des Zwei-Elternkreuzungsprotokolls. Für Arbeiten mit dem Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7002 wurde das BG11-Medium durch A⁺-Medium (Tab. 3) ersetzt.

Nicht mobilisierbare Plasmide wurden durch Transformation in *Synechocystis* übertragen. Hierzu wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur (OD₅₅₀~1) sedimentiert und in 200 µl BG11-Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA wurde der Ansatz für 6 Stunden bei 30 °C unter Licht inkubiert. Im Folgenden wurde der Ansatz entweder

direkt auf BG11-Agarplatten mit geringer Antibiotikakonzentration (25-50 % der maximalen Konzentration (Tab. 4) ausplattiert oder mit Antibiotika-freiem BG11-Medium auf 20 ml verdünnt und nach 24-stündiger Inkubation bei 30 °C im Schüttelkolben auf selektivem Medium ausplattiert. Nach 7- bis 21-tägiger Inkubation bei 30 °C unter Licht konnten Einzelkolonien auf Nährmedium mit höheren Antibiotikakonzentrationen übertragen werden. Für die Selektion auf die Abwesenheit des *sacB*-Gens wurden die Transformationsansätze mit BG11-Medium auf 20 ml verdünnt und entweder direkt oder nach einer 2-tägigen Adaptationsphase mit 5 % (w/v) Saccharose versetzt. Nach 4-tägiger Inkubation (30 °C und Licht) im Saccharose-haltigen Medium wurden Aliquotes der Kultur auf BG11-Sac-Agarplatten (Tab. 3) ausplattiert. Nach etwa 14 Tage konnten so Saccharose-insensitive Einzelkolonien isoliert werden.

Die Sedimentation der cyanobakteriellen Zellen erfolgte in allen Protokollschritten bei mindestens 20 °C und maximal 3000 x g (Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments).

2.3.12 Erzeugung modifizierter *Synechocystis*-Stämme durch homologe Rekombination

Nicht in *Synechocystis* replizierende Plasmide, die ein modifiziertes Allel codieren, wurden durch Transformation oder Konjugation in *Synechocystis* übertragen. Durch homologe Bereiche von 1-3 kb *upstream* und *downstream* des veränderten Allels wurde eine homologe Rekombination des Plasmids mit der genomischen DNA ermöglicht. Hierbei kommt es in *Synechocystis* zu einem direkten Austausch des ursprünglichen Allels gegen das modifizierte Allel. Um einen homozygoten Stamm zu erhalten war jedoch die Segregation des Allels notwendig. Diese wurde durch wiederholte Reinheitsausstriche von Einzelkolonien auf Nähragar mit steigenden Antibiotikakonzentrationen erreicht. Bei der Selektion auf einen Saccharose-insensitiven Phänotyp (siehe auch 2.3.11) war keine Segregation notwendig. Mittels PCR (2.3.4) wurden die Genotypen der neuen Stämme überprüft.

2.4 Strategien zur Herstellung von Stämmen für diese Arbeit

Die hier beschriebenen Plasmide und Stämme sind auch in Tab. 1 bzw. Tab. 2 aufgeführt. Klonierungen wurden in den *E. coli*-Stämmen JM109, XL1-blue und NEB-10 beta durchgeführt. Für den konjugativen Plasmidtransfer wurde der *E. coli*-Stamm S17-1 verwendet (siehe auch 2.3.9 und 2.3.11).

2.4.1 Heterologe Expression der SH aus *R. eutropha* in Cyanobakterien

Das pSK_SH-Plasmid wurde von Caspar Schäfer und Alexander Schwarze wie folgt konstruiert: Ein ClaI/NdeI-behandeltes 996 bp-großes PCR-Produkt mit *hyp*'*XhoxA*' wurde in den mit NdeI/ClaI verdauten pSK9-Vektor eingefügt. In einem zweiten Schritt wurde ein 13 667 bp-NdeI-Fragment aus pCH1428 mit *strep-hoxFUYHIWhypA2B2F2CDEX*' in das mit NdeI geöffnete pSK9-Derivat eingefügt. Die Klone mit der gewünschten Orientierung wurden selektiert.

Für weitere Ansätze zur heterologen Expression der SH in Cyanobakterien wurden modular aufgebaute Expressionskassetten mit standardisierten Restriktionsschnittstellen etabliert (siehe auch 3.1.2.1). Eine Übersicht aller im Folgenden beschriebenen Plasmide findet sich auch im Anhang in Tab. S3. Die im Folgenden erwähnten Oligonukleotide sind im Anhang in Tab. S1 aufgeführt. Zur Eliminierung einer NdeI-Restriktionsschnittstelle im *hypX*-Gen wurde mittels Drei-Primer-PCR mit den Primern ka55, ka56 und ka57 eine stille Mutation in das 977 bp-große *hyp*'*X*-Fragment eingefügt. Weiterhin wurde durch die PCR eine für das Baustein-Prinzip grundlegende MCS (*multiple cloning site*) aus SpeI/NotI/SbfI/HindIII/(XbaI) an das *hypX*-Gen angefügt. Das phosphorylierte PCR-Produkt wurde in den SnaBI/StuI-verdauten LITMUS29-Vektor ligiert, um das Plasmid pDAK41 zu erhalten. Das modifizierte *hyp*'*X*-Fragment wurde als 971 bp-großes MfeI/XbaI-Fragment in das MfeI/SpeI-verdaute #2904-Plasmid eingefügt und so das Plasmid pDAK27 erzeugt. Eine *upstream* des Promotors gelegene MCS aus AvrII/BsrGI/HindIII/NotI/XbaI sowie eine NdeI-Restriktionsschnittstelle zwischen Promotor und *Strep*-Tag II-codierender Sequenz wurden durch Amplifikation des P_{nrsB} -Promotors aus *Synechocystis* mit den Primern ka43/ka44 etabliert. Das hierbei erhaltene PCR-Produkt wurde phosphoryliert und in den EcoRV-verdauten LITMUS29 ligiert, um das Plasmid pDAK28 zu erhalten. Ein 896 bp-XbaI/BstBI-Fragment aus pDAK28 mit P_{nrsB} -NdeI-*strep*' wurde in den gleichartig geschnittenen pDAK27-Vektor umgesetzt und so das Plasmid pDAK29 mit einer XbaI- P_{nrsB} -NdeI-*strep-hoxFUYHWHypA2B2F2CDEX*-SpeI/NotI/SbfI/HindIII-Kassette erhalten. Das eine gleichartige Kassette mit ausschließlich den *hox*-Genen enthaltende pDAK30-Plasmid wurde durch Ligation eines 5630 bp-NdeI/TatI-Fragments aus pDAK28 mit *strep-hoxFUYHWT*', einem durch Hybridisierung der Oligonukleotide ka45 und ka46 erhalten Linker mit *hox*'*I* und dem durch Restriktion mit NdeI/SpeI-erhaltenen Rückgrat von pDAK29 erzeugt. Das pDAK32-Plasmid, welches eine Kassette mit ausschließlich den *hyp*-Genen enthält, wurde durch Ligation eines 1212 bp-NdeI/AgeI-Fragments aus pDAK31 mit dem ebenso verdauten pDAK29-Plasmid erhalten. Das pDAK31-Plasmid war zuvor durch Ligation des mit den

Primern ka47/ka48 amplifizierten und phosphorylierten PCR-Produkts mit *hypA2B2*' in den mit EcoRV verdauten LITMUS29-Vektor erzeugt worden. Ein den *downstream*-Bereich des *nrsBAC*-Locus codierendes Fragment (~1 kb) wurde mit den Primern ka49/ka50 aus dem *Synechocystis*-Stamm SD102 amplifiziert, phosphoryliert und in den SnaBI/StuI-verdauten LITMUS29-Vektor eingefügt. Aus dem so erhaltenen pDAK33-Plasmid wurde ein 1035 bp-XbaI/PstI-Fragment mit *nrs*'C in die mit SpeI/SbfI verdauten Plasmide pDAK29, pDAK30 und pDAK32 umgesetzt, um die Plasmide pDAK34, pDAK35 und pDAK36 zu erhalten. Außerdem wurde das 894 bp-AvrII/NdeI-Fragment aus pDAK28 in die mit AvrII und NdeI verdauten Plasmide pDAK29, pDAK30 und pDAK32 ligiert um die Plasmide pDAK51, pDAK52 und pDAK53 zu erzeugen.

Für die unter 3.1.2.2 näher beschriebene Strategie zur heterologen Expression der SH von einem Weitwirtsplasmid wurden die im Folgenden beschriebenen Plasmide konstruiert. Der *psbAII*-Promotor wurde mit den Primern ka51/ka52 von genomischer DNA aus *Synechocystis* amplifiziert und das phosphorylierte PCR-Produkt in den SnaBI/StuI-verdauten LITMUS29 eingefügt. Aus dem so erhaltenen Plasmid pDAK37 wurde ein 178 bp-XbaI/NdeI-Fragment mit P_{psbAII} in die mit XbaI/NdeI verdauten Plasmide pDAK29, pDAK30 und pDAK32 umgesetzt um die Plasmide pDAK38, pDAK39 und pDAK40 zu erhalten. Die P_{psbAII} -*strep-hoxFUYHWIhypA2B2F2CDEX*-Kassette wurde als 14014 bp-XbaI/SpeI-Fragment in den mit XbaI-geöffneten pVZ321-Vektor ligiert. Plasmide mit beiden Orientierungen des Inserts wurden isoliert und als pDAK42o1 und pDAK42o2 bezeichnet. Das *eyfp*-Gen aus dem BioBrick BBa_E0030 wurde durch PCR mit den Primern ka75/ka76 amplifiziert und am 5'-Ende mit einem *strep*-Tag versehen. Das mit BstBI/SpeI behandelte PCR-Produkt wurde in das ebenso verdaute pDAK52-Plasmid ligiert um das Plasmid pDAK62 zu erhalten. Durch Einfügen eines 177 bp-XbaI/NdeI-Fragments aus pDAK38 in das ebenso geschnittene pDAK62-Plasmid wurde der P_{nrsB} - gegen den P_{psbAII} -Promotor ausgetauscht und das Plasmid pDAK63 erzeugt. Ein 938 bp-großes XbaI/SpeI-Fragment mit der P_{psbAII} -*strep-eyfp*-Kassette wurde aus diesem Plasmid in den XbaI-geöffneten Vektor pVZ321 umkloniert. Nur Klone mit der Cm^R -Kassette *downstream* der Expressionskassette wurden isoliert und als pDAK72o1 bezeichnet. Ein 8241 bp-XbaI/SpeI-Fragment aus pDAK40 mit P_{psbAII} -*hypA2B2F2CDEX* wurde in das mit SpeI-geöffnete Plasmid pDAK39 ligiert. Plasmide mit beiden Orientierungen des Inserts wurden isoliert und als pDAK55o1 und pDAK55o2 benannt. Ein 151 bp-großes XbaI/PstI-Fragment auf dem ein doppelter Terminator codiert ist (BBa_B0015), wurde in die mit SpeI/SbfI verdauten Plasmide - pDAK38, pDAK39, pDAK40 und pDAK63 - eingefügt, um die Plasmide pDAK81 bis pDAK84 zu erhalten. Aus pDAK81

und pDAK84 wurden die P_{psbAII} -*strep-hoxFUYHWHI**hypA2B2F2CDEX-terminator*- und P_{psbAII} -*strep-eyfp-terminator*-codierenden Expressionskassetten als XbaI/SpeI-Fragment in den mit XbaI-geöffneten Vektor pVZ321 umkloniert. Die hierbei entstandenen Plasmide wurden als pDAK85o1/pDAK85o2 bzw. pDAK86o1/pDAK86o2 bezeichnet.

Die Konstruktion der für die homologe Rekombination in den *nrsBAC*-Locus vorgesehenen Kassetten (vgl. 3.1.2.3) erfolgte wie nachstehend beschrieben. Der aus dem BioBrick BBa_B0015 stammende Terminator wurde als 158 bp-XbaI/SpeI-Fragment in das mit XbaI geöffnete Plasmid pDAK33 ligiert und so das Plasmid pDAK61 erzeugt. Aus pDAK61 wurde ein 1172 bp-XbaI/PstI-Fragment mit *terminator-nrs'C* in die mit SpeI/SbfI verdauten Plasmide pDAK62 und pDAK52 umkloniert, um die Plasmide pDAK64 und pDAK70 zu erzeugen. Durch Umsetzen der 2788 bp-XbaI/SpeI- P_{nrsB} -*strep-eyfp-terminator-nrs'C*-Kassette aus pDAK64 sowie der 7995 bp-XbaI/SpeI- P_{nrsB} -*strep-hoxFUYHWHI-terminator-nrs'C*-Kassette aus pDAK70 in den mit XbaI geöffneten Vektor pLO3 wurden die Plasmide pDAK65 und pDAK71 erhalten. Eine Erweiterung der für die Rekombination wichtigen homologen Bereiche wurde mit den folgenden Konstruktionen angestrebt. Ein mit den Primern ka77/ka78 erhaltenes, 1654 bp-großes PCR-Produkt mit *nrsSR'* aus *Synechocystis* wurde phosphoryliert und in den mit EcoRV-geöffneten LITMUS29 ligiert um das Plasmid pDAK66 zu erhalten. Ein 759 bp-NheI-Fragment aus pDAK28 mit *nrs'R*(P_{nrsB}) wurde in das mit NheI geöffnete Plasmid pDAK66 eingefügt. Unter Berücksichtigung der korrekten Orientierung wurde das Plasmid pDAK67 erhalten. Weiterhin wurde ein 2197 bp-großes PCR-Produkt der Primer ka79/ka80 phosphoryliert und in den mit EcoRV geöffneten Vektor LITMUS29 eingefügt. Das so erzeugte Plasmid pDAK68 codiert den *nrs'CD*-Abschnitt aus *Synechocystis*. Als 2197 bp-ClaI/SpeI-Fragment wurde dieser Bereich in das ebenso geschnittene Plasmid pDAK61 eingefügt um das den vollständigen *nrs'CD*-Bereich codierende Plasmid pDAK69 zu erhalten.

Für die Konstruktion einer Δ *hoxEF3UY67H*(*Syn6803*)::Spec^R-*sacB*-Deletionskassette wurde zunächst der *sacB*-Marker mit den Primern ka66/ka67 von genomischer DNA des *Synechocystis*-Stamms SD102 amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt sowie der Primer ka68 dienten als Matrize für eine zweite PCR zur Amplifikation der Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenz vermittelnden Gene (Spec^R) vom Plasmid pB-BioY-mCer-Sm. Das durch die Drei-Primer-PCR-erhaltene Fragment wurde phosphoryliert und in den mit EcoRV verdauten Vektor LITMUS28 kloniert. Die Klone des erhaltenen Plasmids pDAK54 wurden durch Überprüfung der Saccharose-Sensitivität und der Spec-Resistenz selektiert. Der *upstream*-Bereich von *hoxE* und der *downstream* Bereich von *hoxH* in *Synechocystis* wurden

mit den Primern ka69/ka70 bzw. ka71/ka72 amplifiziert (je ~1 kb), phosphoryliert und in den SnaBI/StuI-verdauten Vektor LITMUS28 ligiert. Die so erhaltenen Plasmide pDAK57 und pDAK56 wurden durch Sequenzierung überprüft. Durch Umsetzen eines 1022 bp-großen SpeI/BsiWI-Fragments aus pDAK56 in das gleichermaßen geschnittene Plasmid pDAK54 wurde das Plasmid pDAK58 erhalten. In dieses wurde durch Restriktion mit XbaI und SacI ein 1008 bp-großes Fragment aus pDAK57 eingefügt und so das Plasmid pDAK59 generiert, welches für die Transformation in den *Synechocystis* Wildtyp-Stamm eingesetzt wurde. Der isolierte Stamm wurde als $\Delta hox59\alpha$ bezeichnet.

2.4.2 Das Cytochrom *c*₆-Expressionssystem

Für die heterologe Produktion des Cytochrom *c*₆ von *Synechocystis* in *E. coli* wurde zunächst das Plasmid pDAK1 konstruiert. Dazu wurde das *petJ*-Gen ohne Stopcodon durch PCR mit den Primern ka1/ka2 von genomischer DNA aus *Synechocystis* amplifiziert. Das phosphorylierte PCR-Produkt wurde in den mit EcoRV verdauten Vektor LITMUS28 kloniert. Nach Verifikation des so erhaltenen Plasmids pHELP1 durch Sequenzierung wurde ein 362 bp-PciI/BglII-Fragment mit *petJ*_{ΔStop} in den NcoI/BglII-geschnittenen Vektor pQE60 umgesetzt und so das P_{T5-lacO}-*petJ*-*his6*-codierende Plasmid pDAK1 erhalten. Für die Optimierung der heterologen Produktion wurde das Plasmid pDAK3, in welchem die *leader*-Sequenz des *petJ*-Gens durch die *leader*-Sequenz des *pelB*-Gens aus *E. coli* ersetzt wurde, etabliert. Hierzu wurde ein mit den Primern ka3/ka2 erhaltenes PCR-Produkt mit AflIII/BglII behandelt und in das AflIII/BglII-verdaute Plasmid pCH675-pelB-Rp-HF eingefügt.

2.4.3 Megaplasmid-basierte *hoxY*-Mutanten

Zur Etablierung des *R. eutropha*-Stamms HF1009, der eine *Strep*-Tag-tragende Version der SH mit wildtypischer HoxY-Untereinheit im MBH⁺, RH⁺, AH⁺ Hintergrund codiert, wurde ein 5'-UTR_{hoxF}-*strep-hoxF*-codierendes 969 bp-PshAI/Ecl136II-Fragment aus dem Plasmid #2904 in das PmeI-verdaute Suizidplasmid pLO3 kloniert. Das erhaltene Plasmid pCH1655 wurde genutzt um das wildtypische *hoxF*-Allel im Stamm HF869 [$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$] zu ersetzen (2.3.10). Ausgehend von dem hieraus resultierenden Stamm HF1009 wurden 20 Stämme mit gezielten Einzelaminosäureaustauschen in HoxY (HF1010-HF1017, HF1019-HF1028 und HF1030) bzw. mit einem Motivaustausch in HoxY (HF1018) etabliert.

Für die Erzeugung der Einzelaminosäureaustausch-Mutanten wurde durch Umsetzen eines *hox'UY'*-codierenden 936 bp-AgeI/SacI-Fragments aus dem Plasmid #2904 in den ebenso verdauten Vektor LITMUS29 das Plasmid pCH1617 konstruiert. Dieses diente als Template

für QuickChange-Mutagenese-PCRs (2.3.5) mit den im Anhang in Tab. S2 aufgeführten Oligonukleotiden. In den hierbei entstandenen Plasmiden, pCH1618-pCH1635 und pCH1648 wurde das *hox'UY**-Fragment durch Sequenzierung überprüft und als 978 bp-großes SacI/PstI-Fragment in den gleichartig-verdauten Vektor pLO3 umkloniert. So wurden die Plasmide pCH1657-pCH1663, pCH1665-pCH1674 und pCH1648 erhalten. Aus dem zwei SacI-Erkennungssequenzen-enthaltenden pCH1618 wurde ein 1068 bp-großes StuI/SnaBI-Fragment in den mit PmeI verdauten Vektor pLO3 umkloniert und das Plasmid pCH1656 erhalten. Die pLO3-Derivate wurden genutzt um mittels homologer Rekombination einen Austausch des *hoxY*-Allels im Stamm HF1009 vorzunehmen (2.3.10). Auf diese Weise wurden die Stämme HF1010-HF1017, HF1019-HF1028 und HF1030 produziert.

Für den Austausch des CGCWGCTLSFL-Motivs (HoxY Aminosäuren 39-49) gegen das ACCAIMMAST-Motiv aus dem Nqo6-Protein des Komplex I von *Thermus thermophilus*, wurden der *upstream* und der *downstream* Bereich (je ~500 bp) des entsprechenden DNA-Abschnitts durch PCR mit den Primern ka28/ka29 und ka30/ka31 (Tab. S1) und dem Plasmid pCH1617 als Template amplifiziert. Durch eine *overlapping* PCR mit den Primern ka28/ka31 und den beiden gereinigten PCR-Produkten als Template, konnte ein die HoxY^{Nqo6}-Variante codierendes Fragment erhalten werden. Nach Behandlung mit SacI und PstI wurde dieses in den ebenfalls mit SacI/PstI verdauten Vektor pLO3 ligiert. Das entstandene Plasmid pCH1664 wurde nach Verifikation durch Sequenzierung zum Allelaustausch im Stamm HF1009 verwendet. Der so produzierte Stamm wurde als HF1018 benannt.

2.4.4 Expressionssystem für eine *Strep*-Tag-tragende Version der SH aus *R. opacus*

Unter Verwendung einer konservierten XhoI-Schnittstelle im 5'-Bereich der *hoxF*-Gene von *R. eutropha* H16 und *R. opacus* MR11 wurde ein Chimäre aus dem bereits bestehenden *strep-hoxF* (*ReH16*) und dem *hoxF* (*RoMR11*) Allel erstellt. Dazu wurde unter Berücksichtigung der korrekten Orientierung ein 256 bp-großes XhoI-Fragment aus dem Plasmid pCH751 in das ebenfalls mit XhoI verdaute Plasmid #2904 (3110 bp-Fragment) eingefügt und das Plasmid pDAK90b erhalten. Das chimäre P_{SH}-*strep-hoxF* wurde als 470 bp-großes AflIII/ScaI-Fragment aus pDAK90b zusammen mit einem *hox'FUYHWT* (*RoMR11*)-*hypA2B2F2* (*ReH16*)-codierenden ScaI/SpeI-Fragment aus pCH758 in den AflIII/SpeI-verdauten Vektor LITMUS29 umgesetzt. Das so erhalten Plasmid wurde als pDAK91b benannt. Die Expressionskassette der *StepII*-Tag-tragenden Version der SH aus *R. opacus* wurde als 9707 bp-großes HpaI/SpeI-Fragment in den ScaI/SpeI-verdauten Vektor pEDY309 umkloniert um das Plasmid pDAK93 zu erhalten. Das Plasmid pDAK94, welches den

kompletten Satz der *hyp*-Gene aus *R. eutropha* codiert, wurde durch Einfügen des 7186 bp-großen HpaI/FseI-Fragments aus dem Plasmid pDAK91b in das ScaI/FseI-verdaute Plasmid #3001 erhalten. Das Plasmid pDAK93 wurde in den *R. eutropha*-Stamm HF424 [Δ *hoxFUYHW**(*ReH16*)] übertragen. Während das Plasmid pDAK94 im Megaplasmid-freien Stamm HF210 zur heterologen Produktion der SH aus *R. opacus* eingesetzt wurde.

Für heterologe Produktion des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase- und des Hydrogenasemoduls der SH aus *R. opacus* wurden zunächst die Plasmide pDAK109 und pDAK110 konstruiert. Für das Plasmid pDAK109 wurde ein mit NcoI/BamHI behandeltes PCR-Produkt mit *strep-hoxFU*(*RoMR11*), das durch PCR mit den Primern ka95/ka96 und dem Plasmid pCH758 als Template erhalten wurde, in den NcoI/BglII-verdauten Vektor #5238 eingefügt. Für das Plasmid pDAK110 wurde ein mit NcoI/BglII behandeltes PCR-Produkt mit *strep-hoxYHW*(*RoMR11*), welches durch PCR mit den Primern ka97/ka102 und dem Plasmid pCH758 als Template erhalten wurde, in den gleichartig verdauten Vektor #5238 ligiert. Ein *strep-hoxFUYHW*(*RoMR11*)-codierendes Plasmid ohne Anteil an *hoxF*(*ReH16*) wurde durch die Ligation des 7369 bp-NcoI/BamHI-Fragments aus pDAK110 mit dem 662 bp-NcoI/ClaI-Fragment aus pDAK109 und dem 1944 bp-BamHI/ClaI-Fragment aus pCH758 erhalten und als pDAK111 benannt. Die 2914/3000/5512 bp-großen SpeI-Fragmente aus den Plasmiden pDAK109, pDAK110 und pDAK111 wurden in den mit XbaI geöffneten Vektor pEDY309 umkloniert, um die Plasmide pDAK113, pDAK114 und pDAK115 zu erhalten. Plasmide bei denen die Orientierung des P_{SH}-Promotors mit der des P_{Tet}-Promotors übereinstimmt wurden als o1 bezeichnet; die Plasmide mit entgegengesetzt orientierten Expressionskassetten als o2. Die das NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul-codierenden Plasmide - pDAK109, pDAK113o1 und pDAK113o2 - wurden in den *R. eutropha*-Stamm HF210 übertragen. Die das Hydrogenasemodul bzw. die heterotetramere SH codierenden Plasmide - pDAK110, pDAK111 und pDAK114o1 - wurden im Stamm HF424 getestet. Die Plasmide - pDAK115o1 und pDAK115o2 - wurden in dem Stamm HF1054, ein *hoxI*-freies Derivat des Stamms HF424 (siehe Tab. 2), getestet.

2.5 Expression und Reinigung von Proteinen und Proteinkomplexen

2.5.1 Reinigung von Cytochrom *c*₆ aus *E. coli*

E. coli-Zellen (BL21(DE3)/ pDAK3 + pEC86), die das Cytochrom *c*₆ (His10-Cyt *c*₆) von *Synechocystis* produzierenden, wurden wie in 2.2.2 beschrieben angezogen. Das Zellpellet

von 400 ml Kultur (~ 1 g Zellen) wurde in 2,5 ml Aufschlusspuffer (TrisHCl (50 mM, pH 8,0) mit Proteaseinhibitor) resuspendiert. Dieser wie alle weiteren Schritte der Reinigung wurde bei 4 °C durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit der French Press bei 16 000 psi (kleine Zelle, 2 Durchgänge). Durch 45-minütige Ultrazentrifugation bei 88 000 x g wurden unaufgeschlossene Zellen sowie die Membranfraktion abgetrennt. Das so gewonnene lösliche Extrakt wurde auf eine zuvor mit dem Aufschlusspuffer äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Matrix (1 ml) gegeben. Durch viermaliges Waschen mit 30 mM Imidazol-Puffer (Imidazol (30 mM) in TrisHCl (50 mM, pH 8,0)) und zweimaliges Waschen mit 50 mM Imidazol-Puffer wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Mit zunächst 2 Volumen 100 mM Imidazol-Puffer gefolgt von 3 Volumen 150 mM Imidazol-Puffer wurde das His10-Cyt *c*₆-Protein von der Ni²⁺-NTA-Matrix eluiert. Durch Waschen mit je 3 Volumen 300 mM Imidazol-Puffer, 0,5 N NaOH und 30 % (v/v) Ethanol wurde die Ni²⁺-NTA-Matrix regeneriert und bis zur erneuten Verwendung in 30 % (v/v) Ethanol gelagert. Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden unter Verwendung eines *Amicon*-Zentrifugenfilters (mit 3 kDa Ausschlussvolumen) auf 0,5-1 ml eingengt, wobei der Puffer gegen Imidazol-freien Puffer (TrisHCl (50 mM, pH 8,0)) ausgetauscht wurde. Die His10-Cyt *c*₆-Lösung wurde mit 10-15 % (v/v) Glycerin versetzt, aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Reinigung von PSI-Derivaten aus *Synechocystis*

Die trimeren Formen des His10-PSI-WT und des His10-PSIΔPsaE sowie die monomere Form des PsaD-freien PSI wurden aus den wie unter 2.2.4 beschrieben angezogenen Zellen der *Synechocystis*-Stämme PSI-His WT, PSI-His Δ*psaE* bzw. Δ*psaD* gereinigt. Die Reinigung erfolgte im Wesentlichen wie bei A. Schwarze, 2010 beschrieben. Alle Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Wenn möglich wurde die Probe vor Licht geschützt. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen im dreifachen Volumen an Thylakoidpuffer (HEPES-KOH (50 mM, pH 7,0) mit 5 mM MgCl₂, 25 mM CaCl₂, 10 % Glycerin + Proteaseinhibitor) resuspendiert und zusammen mit einem Volumen an Glass Beads (0,1 mm/ 0,5 mm 1:1) in ein 30 ml-Pufferfläschchen überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Schlagen für 10 min mit 30 Hz in der Zelmühle (MM301, Retsch). Der Zellextrakt wurde durch Zentrifugation (Megafuge, Heraeus Instruments) bei 3000 x g für 5 min von den Glasperlen getrennt und durch Ultrazentrifugation (Sorvall Ultra pro 80 mit Festwinkelrotor T-647,5, Thermo Scientific) bei 15 000 x g für 30 min in Membranfraktion und löslichen Extrakt aufgetrennt. Die im Wesentlichen aus Thylakoidmembran bestehende Membranfraktion wurde zweimal mit Thylakoidpuffer gewaschen. Nach der dritten Ultrazentrifugation wurden die

Thylakoidmembranen in einem Volumen Chromatographiepuffer (MES-KOH (50 mM, pH 6,5) mit 5 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 + Proteaseinhibitor) homogenisiert. Die enthaltenen Proteine wurden durch Zugabe von 2 % (w/v) n-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) solubilisiert und durch Ultrazentrifugation bei 100 000 x g für 45 min von den unlöslichen Membranbestandteilen getrennt.

Zur Isolation der PSI Δ PsaD-Monomer-Komplexe wurden die solubilisierten Proteinkomplexe der Thylakoidmembran direkt im kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Dazu wurde der auf 0,5 ml konzentrierte Membranextrakt auf einen mit Thylakoid-Puffer ohne Glycerin (HEPES-KOH (50 mM, pH 7,0) mit 5 mM MgCl_2 , 25 mM CaCl_2 und 0,03 % DDM) präparierten 10-25 % (w/v) Saccharosegradienten ($V = 40$ ml, $r = 2,5$ cm) aufgetragen und für 16 h bei 100 000 x g zentrifugiert (L-70 mit Swing-out Rotor SW28, Beckmann). Die PSI-Monomer-Bande wurde isoliert und der Proteinkomplex unter Verwendung eines *Amicon*-Zentrifugenfilters (mit 100 kDa Ausschlussvolumen) in Thylakoidpuffer mit 0,03 % (w/v) DDM umgepuffert. Die Konzentration der Proteinlösung wurde auf 1 mg Chlorophyll (Chl) ml^{-1} (3,6 mg Protein ml^{-1} / 12 μM PSI(Mon)) eingestellt und Aliquotes in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Isolation der His10-PSI-WT und His10-PSI Δ PsaE-Komplexe wurde das Membran-Solubilisat auf eine mit Chromatographiepuffer (mit 0,03 % (w/v) DDM) äquilibrierte *Strep*-Tactin-Matrix (4 ml) gegeben. Nach dem Waschen der Matrix mit 7 Volumen des gleichen Puffers wurden die His10-PSI-Komplexe unter Verwendung von Chromatographiepuffer mit 200 mM Histidin eluiert. Zur Trennung der Monomer- und Trimerkomplexe wurde das konzentrierte Eluat wie für die PSI Δ PsaD-Komplexe beschrieben auf einen Saccharosegradienten appliziert. Die Aufarbeitung und Aliquotierung erfolgte wie oben beschrieben. Für die Experimente an der funktionalisierten Goldelektrode wurden außerdem 150 μl -Aliquotes mit einer Konzentration von 90 μg Chl ml^{-1} präpariert.

2.5.3 Reinigung von SH-Derivaten aus *R. eutropha*

Für die Reinigung von *Strep*-Tag II-tragenden SH-Derivaten mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie wurden die entsprechenden *R. eutropha*-Stämme (siehe Tab. 2) wie unter 2.2.3 beschrieben angezogen. Zur Aufarbeitung des heterotetrameren (HoxFUYH) bzw. heterohexameren (HoxFUYH $_2$) SH-Proteins wurde das SH4-Puffer- (50 mM TrisHCl (pH 8,0) mit 150 mM KCl und 5 % (v/v) Glycerin) bzw. das SH6-Puffersystem (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,1) mit 5 % (v/v) Glycerin) verwendet. Alle im Folgenden

beschriebenen Schritte der Reinigung wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden in 1-2 Volumen des Aufschlusspuffers (Puffer + 5 mM NAD⁺ + Proteaseinhibitor, ohne DNaseI) resuspendiert und mit der French Press (2 Durchgänge bei 16 000 psi (kleine Zelle) bzw. 18 000 psi (große Zelle)) aufgeschlossen. Bei der Präparation von SH-Proben für spektroskopische Untersuchungen wurde der Zellextrakt mit Argon überschichtet um die Proben im besonderen Maße vor oxidativen Schädigungen zu schützen. Der Zellextrakt wurde durch 45-minütige Ultrazentrifugation (Sorvall Ultra pro 80 mit Festwinkelrotor T-647,5 bzw. T1270, Thermo Scientific) bei 100 000 x g fraktioniert und der als lösliche Extrakt bezeichnete Überstand auf eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte *Strep*-Tactin-Säule appliziert. Bei kleinen Volumina (bis 5 ml löslicher Extrakt) wurde der Durchlauf aufgefangen und nochmals auf die Säule gegeben um die Proteinausbeute zu erhöhen. Nach gründlichem Waschen mit 4 Säulenvolumen (SV) Aufschlusspuffer und 6 SV Puffer wurde der Proteinkomplex mit bis zu 10 SV Puffer + 5 mM Desthiobiotin eluiert. Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden mit einem *Amicon*-Zentrifugenfilter (100 kDa Ausschlussvolumen) konzentriert und der Puffer gegen Desthiobiotin-freien Puffer ausgetauscht. Zur Konzentration der Proben in Volumina unter 200 µl wurden *Amicon*-Ultra 0.5 50K Zentrifugationsfilter (Millipore) verwendet. Aliquotes der gereinigten SH-Proteine wurden in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.4 Reinigung der SH von *R. opacus* aus *R. eutropha*

Ausgehend von dem Protokoll zur Reinigung der SH von *R. eutropha* wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll zur Reinigung der heterolog in *R. eutropha* produzierten SH von *R. opacus* etabliert. Die *R. eutropha*-Zellen wurden wie für die Produktion der endogenen SH unter mikroaeroben Bedingungen angezogen (2.2.3). Bei der im Wesentlichen wie unter 2.5.3 beschrieben durchgeführten *Strep*-Tactin-Affinätschromatographie wurden das Puffersystem sowie der pH-Wert des Puffers variiert. Es wurden die folgenden Puffersysteme getestet: TrisHCl (50 mM, pH 8,0) mit 5 mM MgCl₂ und 0,5 mM NiCl₂, K-PO₄ (500 mM, pH 7,9) und K-PO₄ (50 mM, pH 7,1/7,5/8,0) mit 5 % (v/v) Glycerin. Bis auf gekennzeichnete Ausnahmen enthielt der Aufschlusspuffer kein NAD⁺. Eine Reinigung wurde mit DNaseI (from bovine pancreas - grade II, Roche Diagnostics, Mannheim) im Aufschlusspuffer durchgeführt. Für die Reinigung des Hydrogenase- bzw. NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls der SH von *R. opacus* wurden auch die Puffersysteme K-PO₄ (50 mM, pH 8,5) mit 0,1 mM NiCl₂ bzw. K-PO₄ (50 mM, pH 7,5) mit 0,5 mM NiCl₂ getestet.

2.5.5 Dissoziation des SH_{RoMR11}-Komplexes mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Ausgehend von dem bei C. Zaborosch, 1989 beschriebenen Protokoll wurde hier versucht eine chromatographische Trennung des SH_{RoMR11}-Komplexes im FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)-Verfahren zu reetablieren. Hierzu wurde ein FPLC-Gerät des Typs *Äkta purifier* (Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA) mit einer fertig gepackten, starken Anionenaustausch-Säule verwendet. Zunächst wurde eine gebrauchte Mono Q 5/50 HR Säule (GE Healthcare, Großbritannien) der AG Schneider und später eine neu angeschaffte Mono Q 5/50 GL Säule (laut Angaben des Herstellers äquivalent zu der nicht mehr geführten HR-Ausführung) eingesetzt. Als Puffer wurden wie bei C. Zaborosch, 1989 25 mM TrisHCl (pH 9,0) und 25 mM TrisHCl (pH 9,0) mit 1 M KCl verwendet. Diese wurden vor ihrer Verwendung filtriert und entgast (15 min Ultraschallbad). Der SH-Komplex (1-2 mg) wurde in 200 µl KCl-freiem Puffer oder in K-PO₄-Puffer (pH 7,1) mit 5 % (v/v) Glycerin konzentriert und auf die Säule aufgetragen. Mehrere Variationen des nicht linearen Elutionsprofils wurden getestet (siehe 3.4.4). Die Durchflussrate lag bei 1 ml min⁻¹, so dass ein maximaler Druck von 4 MPa nicht überschritten wurde. Die Puffer, die Chromatographiesäule sowie der Fraktionssammler wurden auf 4 °C gekühlt. Die FPLC-Anlage inklusive der Mischer und des Schlausystems befanden sich bei Raumtemperatur.

2.6 Allgemeine Techniken zum Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Quantitative Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde standardmäßig mit dem BCATM-Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) bestimmt. Hierbei werden Cu²⁺-Ionen durch das in der Probe enthaltende Protein zu Cu⁺ reduziert, welches mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet. Die Proben unbekannter Proteinkonzentration wurden parallel zu einer Standardreihe aus BSA-Lösungen bekannter Konzentration (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 und 1000 µg ml⁻¹) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Ansätze mit je 200 µl der frischangesetzten Lösung aus Reagenz A und B versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Absorptionen der Ansätze bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem SpectraMax 340 Plattenleser (Molecular Devices, USA) gemessen und die Daten mit der SoftMax Pro v5.0.1 Software (Molecular Devices, USA) ausgewertet. Alle Bestimmungen erfolgten in Doppelt- bzw. Dreifachbestimmung.

2.6.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen (0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)) entsprechend der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970). Standardmäßig wurden hierfür Minigele (10 x 8 x 0,1 cm) mit einer Polyacrylamidkonzentration von 4 % im Sammelgel und 10-16 % im Trenngel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 0,2 - 0,5 Volumen des 5-fach konzentrierten Laemmli-Puffers (TrisHCl (350 mM, pH 6,8) mit 5 % (v/v) Mercapthoethanol, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin und 0,05 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und durch 10-minütiges Erhitzen auf 100 °C denaturiert. Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proben in die zuvor gut mit Laufpuffer gespülten Taschen des Polyacrylamidgels erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 30-40 mA pro Gel unter Verwendung von Tris-Glycin-Puffer (25 mM TrisHCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde der *Precision Plus Protein Dual Color*-Proteinmarker (10-250 kDa, Bio-Rad, USA) verwendet.

2.6.3 Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Zur Visualisierung von Proteinbanden im Polyacrylamidgel wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (R-250 und G-250) verwendet. Das Proteingel wurde zunächst 30 min in der Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Ethanol in H₂O) geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds in Entfärbelösung (5 % (v/v) Methanol, 25 % (v/v) Essigsäure in H₂O) unter kontinuierlichem Schwenken und regelmäßiger Erneuerung der Entfärbelösung inkubiert (modifiziert nach Wilson, 1983).

2.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Zur immunologischen Detektion von spezifischen Proteinen wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace NT, Pall, USA) transferiert. Hierzu wurde das Semi-Dry-Blotverfahren genutzt, bei dem ein „Sandwich“ aus zuvor mit Transferpuffer (25 mM TrisHCl, 192 mM Glycin) benetzten Whatman-Papier, Nitrozellulosemembran, SDS-Gel und Whatman-Papier luftblasenfrei in einer Semi-Dry Blot-Apparatur (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland) gestapelt wird. Durch Anlegen eines Stroms von 240 mA pro Gel für 42 min erfolgte der Proteintransfer. Zur Detektion der Proteine wurden gegen die Untereinheiten der SH

gerichtete Kaninchen-Antikörper (Anti-HoxF (AK61) 1:2500, Anti-HoxH (AK59) 1:25000, Anti-HoxU (AK60) 1:3300, Anti-HoxY (AK62) 1:5000) in Kombination mit einem an die Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-AK-AP-Konjugat (Dianova) 1:10000) bzw. ein an die AP gekoppeltes *Strep*-Tacin-Konjugat (IBA, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Die Nitrozellulosemembran mit den transferierten Proteinen wurde dazu schwenkend in den folgenden Lösungen inkubiert:

- > 30 min Blockpuffer (5 % (w/v) Milchpuffer in TBST-Puffer)
- 3 x 5 min TBST-Puffer (20 mM TrisHCl (pH 7,5) mit 150 mM NaCl und 0,05 % (v/v) Tween-20)
- > 60 min primärer Antikörper bzw. *Strep*-Tactin-Konjugat in TBST-Puffer
- 5 x 5 min TBST-Puffer*
- > 30 min sekundärer Antikörper in TBST-Puffer*
- 3 x 5 min TBST-Puffer
- 2 x 5 min TBS-Puffer (20 mM TrisHCl (pH 7.5) mit 150 mM NaCl)

* nur für Detektion von SH-Proteinen

Durch eine Farbreaktion bei der 5-Bromphenol-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) durch die AP zu einem Indigofarbstoff umgesetzt wird, wurden die Protein-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht. Hierzu wurde eine Lösung mit BCIP (0,1 % (v/v) einer Stammlösung mit 50 mg ml⁻¹ in 100 % Dimethylformamid) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT; 0,1 % (v/v) einer Stammlösung mit 100 mg ml⁻¹ in 70 % Dimethylformamid) in Entwicklungspuffer (TrisHCl (100 mM, pH 9,5) mit 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) frisch angesetzt. Die Membran wurde bis zum sichtbar werden von violetten Banden in dieser Färbelösung in Dunkelheit ohne Schwenken inkubiert. Durch Waschen mit Millipore-H₂O wurde die Farbreaktion gestoppt.

2.6.5 Fluoreszenzmessungen in ganzen Zellen

Je zwei 200 µl-Proben der frisch gewachsenen cyanobakteriellen Kulturen (OD₇₅₀ = 0,4-0,8) wurden in eine schwarzwandige Mikrotiterplatte (BRAND plates™) pipettiert. Die optische Dichte bei 750 nm (OD₇₅₀) wurde mit dem SpectraMaxM2 Plattenleser (Molecular Devices, USA) bestimmt. Die EYFP-Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm mit dem FluoSTAR Omega Mikroplatten-Reader (BMG Labtech GmbH, Deutschland) gemessen. Die mittlere Fluoreszenz der zwei Replikate wurde ins Verhältnis zur OD₇₅₀ der Kultur gesetzt. Die so ermittelte relative

Fluoreszenz wurde auf das Niveau der parallel bestimmten Hintergrundfluoreszenz im jeweiligen Wildtyp-Stamm bezogen.

2.6.6 UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Die UV-vis-Absorptionsspektren wurden mit dem CARY 5000 UV-vis-NIR-Z-Spektrometer (Varian, Palo Alto, USA) aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten in einer 100 µl-Quarzküvette (Varian, optische Weglänge 1 cm) bei 12 °C. Die Hintergrundspektren des jeweiligen Puffers wurden von den aufgezeichneten Absorptionsspektren abgezogen. Die Spektren der unbehandelten (*as isolated*), luftoxidierten SH-Varianten (1-1,5 mg ml⁻¹) wurden auf eine Proteinkonzentration von 1 mg ml⁻¹ normalisiert. Die Redox titration des Cytochrom *c*₆ aus *Synechocystis* wurde durch Aufzeichnung von Absorptionsspektren verfolgt. Hierzu wurde in einer mit einem Septum verschlossenen Küvette eine 1,2 µM Cytochrom *c*₆-Lösung durch Zugabe von 1 µl-Aliquotes einer Natriumdithionit-Lösung zunächst reduziert und im Folgenden durch Zugabe von Aliquotes einer Ammoniumpersulfat-Lösung reoxidiert.

2.6.7 FMN-Gehaltsbestimmung

Der FMN-Gehalt homogener SH-Präparationen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schneider und Schlegel, 1976 bestimmt. Durch Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure wurden die FMN-Kofaktoren aus dem Proteinkomplex extrahiert. Hierzu wurden 45 µl Probe mit dem gleichen Volumen an 20 %-iger (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurden 80 µl des Überstand durch Zugabe von 30 µl KH₂PO₄-Lösung (4 M) neutralisiert. Die FMN-Konzentration der Extrakte wurde im direkten Vergleich mit einer ebenso behandelten Standardreihe aus kommerziell erhältlichem FMN (0,05-20 µM FMN) bestimmt. Hierzu wurde die Fluoreszenz der neutralisierten Extrakte mit dem SpectraMaxM2 Plattenleser (Molecular Devices, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm und einer Emissionswellenlänge von 526 nm (cut-off bei 515 nm, bottom-read) in einer schwarzwandigen Mikrotiterplatte (BRAND plates™) gemessen. Die ermittelte FMN-Konzentration wurde mit der Konzentration der für die Extraktion eingesetzten Proteinlösung ins Verhältnis gesetzt. Hierzu wurde für alle SH-Varianten ein Molekulargewicht von 207 kDa verwendet.

2.7 Biochemische Charakterisierungen

2.7.1 Biochemische Charakterisierung der PSI-Derivate

2.7.1.1 Lichtgetriebene O₂-Reduktionsmessungen mit der Clark-Elektrode

Die O₂-Reduktionsraten der PSI-Komplexe wurden amperometrisch mit einer Clark-Elektrode (Oxygraph, Hansatech Instruments) bestimmt. Der Standardansatz (1 ml) enthielt 5 mM Natriumascorbat, 0,8 mM 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) und 0,5 mM Methylviologen (MV) sowie 2-8 µg PSI in HEPES-KOH (30 mM, pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM. Der auf 30 °C temperierte Ansatz wurde für 2 Minuten in Dunkelheit gerührt und dann mit Rotlicht (~1500 µE m⁻² s⁻¹, vgl. Abb. S1) beleuchtet. Der O₂-Verbrauch unter Lichteinfall wurde um den in Dunkelheit gemessenen Abfall der O₂-Konzentration korrigiert. Für einige Experimente wurde die Konzentration des DCPIP variiert bzw. durch 3,6-14,2 µM Cytochrom *c*₆ aus *Synechocystis* ersetzt. Weiterhin wurden die Aktivitäten in verschiedenen Puffersystemen bestimmt. Eine Zwei-Punkt-Kalibrierung wurde mit luftgesättigtem Wasser (0,23 µmol O₂ ml⁻¹ bei 30 °C) und mit Natriumdithionit versetztem Wasser (0 µmol O₂ ml⁻¹) durchgeführt.

2.7.2 Biochemische Charakterisierung der SH-Varianten

2.7.2.1 H₂-abhängige NAD⁺-Reduktion

Standardmäßig wurde die H₂-abhängige Reduktion von NAD⁺ photometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 3.43 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$, Bergmeyer, H. U., 1983) mit einem Spektrophotometer (Varian Cary50 mit *Multicellholder*) verfolgt. Dabei wurden 2 ml-Reaktionsansätze unter einer Atmosphäre von 1 bar H₂ in mit Septen verschlossenen 3,5 ml-Glasküvetten verwendet. Die Aktivität wurde standardmäßig in H₂-gesättigtem TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) mit 1 mM NAD⁺ bei 30 °C bestimmt (Schneider und Schlegel, 1976). Abweichungen von diesem Puffersystem sind gekennzeichnet. Die angegebenen Zusätze wurden in den folgenden finalen Konzentrationen eingesetzt: Flavinmononukleotid (FMN) 1 µM, Dithiothreitol (DTT) 1 mM, Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP) 1 mM, β-Mercaptoethanol (β-MEtOH) 1 mM, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) 1 µM, reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) 0,25-1 µM. Die Aktivitäten von löslichen Extrakten wurden am Tag des Zellaufschlusses bestimmt. Die Aktivitäten von mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) lysierten Zellen wurden wie bei Friedrich *et al.*,

1981 beschrieben bestimmt, jedoch angepasst auf einen 2 ml-Ansatz mit 1 mM NAD^+ . Dabei wurden 0,15-1 OD_{436} -Äquivalente im Ansatz verwendet. Das entspricht einer finalen Gesamtproteinkonzentration von 14-95 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Die Aktivitäten von isolierten SH-Derivaten wurden mit 0,5-15 μg Proteinkomplex pro Ansatz bestimmt.

Für Aktivitätsmessungen in definierten Gemischen aus H_2 - und O_2 - bzw. H_2 - und N_2 -gesättigtem Puffer wurde der Verbrauch des gelösten H_2 amperometrisch mit einer invertierten Clark-Elektrode (modifizierter Oxygraph, Hansatech Instruments) verfolgt (Wang *et al.*, 1971). Die 1,3 ml-Reaktionsansätze füllten die Reaktionskammer dabei vollständig aus. Eine Zwei-Punkt-Kalibrierung der invertierten Clark-Elektrode wurde mit N_2 -gesättigtem Puffer (0 nmol $\text{H}_2 \text{ ml}^{-1}$) und 100 μl H_2 -gesättigtem Puffer in 1,2 ml N_2 -gesättigtem Puffer (80/1,3 nmol $\text{H}_2 \text{ ml}^{-1}$ bei 30 °C) durchgeführt.

2.7.2.2 NADH-abhängige BV-Reduktion

Die Diaphoraseaktivität der SH-Derivate wurde als NADH-abhängige Benzylviologen (BV)-Reduktionsaktivität photometrisch bei 550 nm ($\epsilon_{\text{BV}} = 7,8 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$, Dawson, R. M. C., 1989) und 30 °C bestimmt. Die mit Septen luftdichtverschlossenen Küvetten enthielten 2 ml-Ansätze mit 0,6 mM NADH, 0,6 mM BV und CTAB-lysierten Zellen (30-80 μg Gesamtprotein) bzw. isoliertem SH-Komplex (0,5-5 μg Protein) in N_2 -gesättigtem TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) unter einer Atmosphäre von 1 bar N_2 .

2.7.2.3 H_2 -abhängige BV-Reduktion

Die Hydrogenaseaktivität der SH-Derivate wurde als H_2 -abhängige Benzylviologen (BV)-Reduktionsaktivität photometrisch bei 550 nm ($\epsilon_{\text{BV}} = 7,8 \text{ ml cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$, Dawson, R. M. C., 1989) und 30 °C bestimmt (Schneider und Schlegel, 1976). Die mit Septen luftdichtverschlossenen Küvetten enthielten 2 ml-Ansätze mit 25 μM NADH, 2,4 mM BV und isoliertem SH-Komplex (5-10 μg Protein) in H_2 -gesättigtem TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) unter einer Atmosphäre von 1 bar H_2 .

2.7.2.4 MV-abhängige H_2 -Produktion

Die Methylviologen (MV)-abhängige H_2 -Produktion wurde entweder amperometrisch in der invertierten Clark-Elektrode oder durch gaschromatographische Analyse der Gasphase der Reaktionsansätze bestimmt. In der invertierten Clark-Elektrode wurde die H_2 -Entwicklung in

1,3 ml-Ansätzen mit 5 mM MV, 7 mM Natriumdithionit (DT) und 1-5 μg Proteinkomplex in N_2 -gesättigtem TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) bei 30 °C *online* verfolgt. Die Kalibrierung der invertierten Clark-Elektrode erfolgte wie oben beschrieben (2.7.2.1). Für die gaschromatographische Analyse wurden 1,3 ml-Ansätze in mit Sepa-Septen gasdicht verschlossenen 7,6 ml-Reaktionsgefäßen wie folgt vorbereitet. Der N_2 -gesättigte TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) und 5 mM MV wurden vorgelegt und die Gasphase im Reaktionsgefäßes gegen N_2 ausgetauscht. Durch Zugabe von 7 mM DT und 1-5 μg SH-Komplex wurde die Reaktion gestartet. Zur Aktivitätsbestimmung in mit CTAB-lysierten *R. eutropha*-Zellen wurden 0,3-1,5 OD_{436} -Äquivalente (das entspricht einer finalen Gesamtproteinkonzentration von 30-145 $\mu\text{g ml}^{-1}$) ebenfalls vorgelegt. Nach der Übersichtung des Ansatzes mit N_2 wurden dann zunächst durch Zugabe von 20 μl 0,5 % (w/v)-iger CTAB-Lösung die Zellen lysiert und nach einer 1-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur die Reaktion durch Zugabe von DT gestartet. Nach 10-30-minütiger Inkubation der Ansätze bei 30 °C wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und 100-500 μl Aliquotes der Gasphase im Gaschromatographen (GC-2014AA, Shimadzu, ausgestattet mit Molekularsieb und *Thermal Conductivity Detector*, Trägergas: Argon) analysiert. Die Kalibrierung des Gaschromatographen erfolgte durch Einspritzen von Proben aus Ansätzen mit bekannter H_2 -Konzentration (z. B. 100 μl H_2 -gesättigter Puffer (30 °C) in 1,2 ml N_2 -gesättigtem Puffer entsprechen 80/1,3 $\text{nmol H}_2 \text{ ml}^{-1}$).

Zur Aktivitätsbestimmung in mit TritonX100 lysierten *Synechocystis*-Zellen wurden 2 ml frischer Kultur mit 2 ml N_2 -gesättigtem K-PO_4 -Puffer (50 mM, pH 7,0) und 5 mM MV in den 7,6 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Nach der Übersichtung des Ansatzes mit N_2 wurden die Zellen durch Zugabe von TritonX100 ($c_{\text{final}} = 0,1 \%$ (v/v)) lysiert und die Reaktion durch Zugabe von 4 mM DT gestartet. Die 4-5-stündige Inkubation erfolgte bei 30 °C in Dunkelheit. Die bestimmten H_2 -Produktionsraten wurden auf die OD_{550} der Kulturen bezogen.

Abweichungen von den beschriebenen Puffersystemen sind gekennzeichnet. Zusätze wurden, wenn angegeben, in finalen Konzentrationen von 1 μM (FMN) bzw. 1 mM (DTT) eingesetzt.

2.7.2.5 H₂/D⁺-Austausch

H₂/D⁺-Austausch-Messungen wurden in dem von Frielingsdorf *et al.*, 2014 beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt. Der TrisHCl-Puffer (50 mM) wurde mit D₂O (99,8 % D) angesetzt und auf einen messbaren pH* von 7,6 eingestellt, dies entspricht laut Krezel und Bal, 2004 einem pD von 8,0. Der Puffer (2 ml) wurde in der auf 30 °C temperierten Reaktionskammer mit H₂ gesättigt, mit 7,5 µM NADH und 5 mM Natriumdithionit versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 2-5 µg SH gestartet. Die Bildung von HD (m/z=3) und D₂ (m/z=4) wurde *online* mit einem mit der Reaktionskammer verbundenen Quadrupol-Massenspektrometer (Omnistar GSD 301, Pfeiffer Vacuum, Deutschland) verfolgt. Durch Kontrollmessung ohne Enzym und mit D₂-begastem Puffer wurden die für den Gasverbrauch des Massenspektrometers charakteristischen Abklingkoeffizienten k_{H_2} , k_{D_2} und k_{HD} unter Verwendung der Formeln (1) + (2) bestimmt.

$$k_{H_2} = \frac{\ln(c_n[H_2]) - \ln(c_0[H_2])}{t_n - t_0} \quad (1)$$

mit $c_n[H_2]$ - gemessene Konzentration an H₂ zum Zeitpunkt t_n (in min)

$$k_{HD} = \frac{k_{H_2} + k_{D_2}}{2} \quad (2)$$

mit k_{D_2} bestimmt analog zu k_{H_2} (siehe (1))

Die Daten der H₂/D⁺-Austausch-Messungen wurden damit unter Verwendung der Formel (3) korrigiert.

$$c_i[HD]_{\text{kor}} = c_i[HD]_{\text{gemessen}} + \sum_{n=1}^i k_{HD} \cdot c_n[HD]_{\text{gemessen}} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (3)$$

mit $c_n[HD]_{\text{gemessen}}$ - gemessene Konzentration an HD (bzw. D₂ oder H₂)
zum Zeitpunkt t_n (in min)

Die Produktion von D₂ durch NADH-abhängige D⁺-Reduktion wurde in luftgesättigtem Puffer getestet. Sie lag jedoch mindestens zwei Größenordnungen unter der H₂-abhängigen D₂-Produktionsrate und wurde deshalb bei der Auswertung vernachlässigt.

2.7.3 Biochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe

2.7.3.1 Versuchsdurchführung zum Nachweis lichtgetriebener H₂-Produktion an der HU Berlin

In mit luftdichten Septen verschlossenen 7,6 ml-Reaktionsgefäßen wurden 1 ml-Ansätze mit je 37 pmol PsaE-freiem PSI-Trimerkomplex (112 pmol Reaktionszentren), 150 pmol SH^{PsaE}, 25 nmol Cyt *c*₆ (25 µM) und 20 mM Natriumascorbat angesetzt. Hierzu wurden 0,9 ml Puffer (HEPES-KOH (30 mM, pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM bzw. K-PO₄ (20 mM, pH 7,0) mit 10 mM MgCl₂ und 0,03 % (w/v) DDM und PSI-Komplex vorgelegt, mit N₂ begast und die übrigen Komponenten über das Septum zugegeben. Die Kontrollansätze enthielten keinen SH^{PsaE}-Komplex. Nach 2-stündiger Inkubation im Licht einer Halogenlampe mit 665 nm-Bandfilter ($\sim 200 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, vgl. Abb. S1) bei Raumtemperatur (33 °C) wurden je 500 µl-Proben der Gasphase im Gaschromatographen analysiert.

2.7.3.2 Versuchsdurchführung zum Nachweis lichtgetriebener H₂-Produktion an der Universität Bochum

In 2 ml-Reaktionsgefäßen wurden 200 µl-Ansätze unter 95 % (v/v) N₂/ 5 % (v/v) H₂-Atmosphäre pipettiert. Die Ansätze enthielten 90 pmol Reaktionszentren des PSI-Derivats, 40 pmol SH-Derivat, 5 mM Natriumascorbat, 0,6 mM DCPIP und optional 20 µM Cytochrom *c*₆ aus *Thermosynechococcus elongatus* in Tricin-KOH (20 mM, pH 7,6) mit 0,03 % (w/v) DDM. Es wurden die Kombinationen aus (1) PSIΔPsaE + SH^{PsaE}, (2) PSIΔPsaD + SH^{PsaD} und (3) PSI-WT und SH^{PetF} getestet. Die vor Licht geschützten, mit luftdichten Septen verschlossenen Reaktionsansätze wurden aus dem Zelt ausgeführt und die Gasphase durch Argon ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation im Licht weißer LEDs ($\sim 400 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) bei 37 °C wurden je 400 µl-Proben der Gasphase im Gaschromatographen analysiert.

2.8 Elektrochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe

2.8.1 Kombinierte SEIRAS und elektrochemische Messungen

Die Funktionalisierung der auf einem Silikonprisma abgeschiedenen Goldoberfläche mit einem PSIΔPsaE-Monolayer erfolgte wie zuvor beschrieben (Krassen *et al.*, 2009) durch

schrittweisen Aufbau eines Ni^{2+} -NTA-Linkers und anschließender Immobilisierung von His10-PSI Δ PsaE-Komplexen. Die Komplementierung des SH-PSI-Hybridkomplexes erfolgte durch Inkubation mit einer $0,75 \mu\text{M}$ SH^{PsaE}-Lösung (in HEPES (20 mM, pH 7,5) mit 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 und 0,03 % (w/v) DDM). Die Modifikation der Goldoberfläche wurde durch *Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy* (SEIRAS) verfolgt (vgl. Krassen *et al.*, 2009). Bei SEIRAS werden durch die Nanostruktur der Goldoberfläche die Signale des IR-Absorptionsspektrums bis zu 100-fach verstärkt, so dass Spektren organischer Moleküle und Proteine, die sich in weniger als 10 nm Entfernung von der Oberfläche befinden, detektiert werden können. Der hier verwendete Versuchsaufbau entsprach dem in Krassen *et al.*, 2009 beschriebenen Setup.

Für die elektrochemischen Messungen wurde die funktionalisierte Goldelektrode in eine von Moritz Senger entworfene Reaktionskammer eingebaut (M. Senger, 2013) und mit HEPES-Puffer (100 mM, pH 7,5) mit 10 mM CaCl_2 (1 mM für SH^{PsaE}-PSI Δ PsaE), 10 mM MgCl_2 (1 mM für SH^{PsaE}-PSI Δ PsaE) und $75 \mu\text{M}$ Phenazinmethosulfat (PMS) überschichtet. Die Goldoberfläche wurde als Arbeitselektrode betrieben. Ein Platindraht und eine Ag/AgCl-Elektrode in 3 M KCl (World Precision Instruments) dienten als Gegen- bzw. Referenzelektrode. Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode wurde ein Potential von -130 mV (vs. NHE) angelegt. Die lichtabhängigen Ströme wurden zwischen Arbeits- und Gegenelektrode mit einem Potentiostat (PARSTAT, Princeton Applied Research, USA bzw. Autolab PGSTAT 12, Eco Chemie B.V., Niederlande) gemessen.

Für die gaschromatographischen Untersuchungen wurde die Gasphase der Reaktionskammer gegen Argon ausgetauscht. Nach 4-5-stündigen Belichtung der Elektrode mit einer Halogenkaltlichtlampe KL1500 wurden Proben der Gasphase (bis zu 1 ml) im Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, ausgestattet mit Molekularsieb (CP Molesieve 5 Angström Column) und *Thermal Conductivity*-Detektor, Trägergas: Argon) hinsichtlich ihres H_2 -Gehalts analysiert.

2.8.2 Messungen an mit Osmium-Polymeren funktionalisierten Elektroden

Zur Präparation der Elektroden wurden je $2,5 \mu\text{l}$ einer aus PSI-Derivat ($1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ Protein), SH-Derivat ($0,5 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$, nicht in den Kontrollen), Redox-Polymer ($5 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$) und Poly(ethyleneglycol)diglycidylether (PEGDGE) ($0,3 \text{ ng} \mu\text{l}^{-1}$) angesetzten Lösung auf die polierten Gold- bzw. Glaskohlenstoffelektroden gegeben. Dieser, wie die weiteren Schritte erfolgte unter Formiergasatmosphäre (95 % (v/v) N_2 , 5 % (v/v) H_2). Über Nacht kam es zu

einer PEGDGE-induzierten Vernetzung des Redox-Polymers. Zum Schutz des PSI wurde dieser Schritt in Dunkelheit durchgeführt. Nach einem einstündigen Wasch- und Äquilibrationsschritt in TrisHCl-Puffer (50 mM, pH 9,0 oder pH 7,0) mit 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 0,03 % (w/v) DDM wurden die elektrochemischen Messungen in Natrium-Citrat-Puffer (10 mM, pH 4,0 oder pH 7,0) mit 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 0,03 % (w/v) DDM mit dem Autolab PGSTAT 12 Potentiostat (Eco Chemie B.V., Niederlande) durchgeführt. Als Referenzelektrode wurde eine 3,5 M Ag/AgCl-Elektrode verwendet. Zunächst wurden unter Formiergasatmosphäre die Photoströme in Abwesenheit und Gegenwart von 3 mM Methylviologen bei einem angelegten Potential von 0 mV vs. Ag/AgCl bestimmt. Dazu wurde der fließende Strom während einer Beleuchtungsphase von etwa 10 s aufgezeichnet. Die Differenz der mittleren Stromstärke unter Beleuchtung mit einer rot-gefilterten Kaltlichtquelle und in Dunkelheit wurde ermittelt und auf die Fläche der Elektrode (Goldelektrode 3,14 mm²; Glaskohlenstoffelektrode 7,068 mm²) bezogen. Die Messungen wurden unter atmosphärischen Bedingungen (21 % (v/v) O₂) mit denselben Elektroden wiederholt.

2.9 Charakterisierung der SH mit spektroskopischen Verfahren

2.9.1 Vorbereitung der reduzierten SH-Proben

Die NADH/H₂-reduzierten Proben wurden bei Raumtemperatur in einer Formiergasatmosphäre (95 % (v/v) N₂, 5 % (v/v) H₂) präpariert. Hierzu wurde der 0,3 mM Proteinlösung 5 mM NADH (als Argon-anaerobisierte Lösung) zugesetzt und der Ansatz für 30 min unter 1 bar H₂ inkubiert. Eine Probe der SH^{C41S}-Variante wurde zusätzlich mit 10 mM Dithiothreitol (DTT, ebenfalls als Argon-anaerobisierte Lösung) versetzt. Die NADH-reduzierten Proben wurden bei Raumtemperatur in einer 100 % (v/v) N₂-Atmosphäre durch die Zugabe von 10 mM NADH (als Argon-anaerobisierte Lösung) zu den 0,3 mM Proteinlösungen präpariert.

2.9.2 *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR)-Spektroskopie

Je 30 µl der 0,3 mM SH-Proben (unbehandelt bzw. reduziert (siehe 2.9.1)) wurden in Q-Bandröhrchen (Innendurchmesser 1 mm) überführt und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die 9,5 GHz-X-Band-Spektren der Präparationen wurden mit einem Bruker ESP300E Spektrometer mit rechteckigem Mikrowellenhohlraumresonator (Bruker, Deutschland) aufgenommen. Die Temperierung der Proben im Bereich zwischen 10 K und 35 K erfolgte in

einem Oxford ESR 900 Helium-Durchflusskryostaten (Oxford ITC4, Oxford Instruments, UK) mittels flüssigen Heliums. Die durch *continuous wave* (CW)-EPR-Spektroskopie aufgenommenen Absorptionsspektren wurden als erste Ableitung dargestellt. Die Basislinienkorrektur erfolgte durch Abzug des für den reinen Puffer gemessenen Hintergrundspektrums. Zur Spin-Quantifizierung wurden die doppelt integrierten Signale mit dem ungekoppelten Signal des $[2\text{Fe}_2\text{S}]^+$ -Clusters verglichen, dessen Intensität als 1 Spin pro SH-Komplex angenommen wurde.

2.9.3 Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Schwingungsspektroskopie

Für die Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Schwingungsspektroskopie wurden je 8 μl der 0,3 mM SH-Proben (unbehandelt bzw. reduziert (siehe 2.9.1)) in eine gasdichte, temperaturkontrollierte IR-Flüssigkeitszelle mit CaF_2 -Fenster (optische Länge 50 μm) überführt. Die FTIR-Spektren wurden mit einem Bruker Tensor 27 Spektrometer (Bruker, Deutschland), das mit einer gobaTM-Infrarotlichtquelle, einem ROCKSOLIDTM-Interferometer sowie mit einem durch flüssigen N_2 gekühlten Mercury-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektor ausgestattet ist, aufgenommen. Die Probenkammer wurde mit einem Peltierelement auf 10 °C temperiert. Je 200 Scans wurden zu einem Spektrum zusammengefasst. Pro Probe wurden 20 Spektren aufgezeichnet und nach Abzug des Referenzspektrums zu einem Absorptionsspektrum gemittelt. Die spektrale Auflösung betrug 2 cm^{-1} . Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden die zweiten Ableitungen der aufgezeichneten Absorptionsspektren gebildet und interpretiert.

2.10 Geräte und Chemikalien

Neben den in den entsprechenden Versuchsprotokollen spezifizierten Geräten wurden folgende Geräte für verschiedene Versuche eingesetzt: French Press des Typs *FRENCH PRESSURE CELL Press* (Sim Aminco, USA) und des Typs *HTU-DIGI-F Press nach Prof. French* (G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland), Rotationsschüttler *Celloshaker - Variospeed Variotime* (Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland), Tischzentrifuge *Heraeus Fresco 21* (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA), Megafuge 2.0 R (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland), Erntezentrifuge *Sorvall RC 6+* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Ultrazentrifugen des Typs *Sorvall Ultra 80 Pro* (Sorvall, DuPont Newtown, USA), Feinwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland), Vortexer *Reax 2000* (Heidolph, Schwabach, Deutschland),

Netzgeräte des Typs *Electrophoresis Power Supply - EPS 3500* (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Bioline GmbH, (Luckenwalde), BIO-RAD (München), Boehringer (Mannheim), DIFCO (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München). Nitrocellulosemembranen und Blotpapier stammten von Schleicher & Schüll (Dassel). Gase lieferte die Firma Air Liquide (Düsseldorf). Deionisiertes und gereinigtes Wasser (Millipore-H₂O) wurde mit einem MembraPure Aquintus (membraPure, Bodenheim) bei einem spezifischen Widerstand von 18,2 MΩ·cm⁻¹ hergestellt.

2.11 Verwendete Software und Datenbanken

Gen- und Aminosäuresequenzen wurden der *NCBI genbank*-, der *NCBI protein*- sowie der *Uniprot*-Datenbank entnommen. Multiple Aminosäuresequenzvergleiche wurden mit *ClustalW* (Thompson *et al.*, 2002) und *ClustalΩ* (Sievers *et al.*, 2011) erstellt und unter Verwendung von *Jalview 2.7* (Waterhouse *et al.*, 2009) manuell nachbearbeitet. Die strukturellen Informationen und PDB-Dateien von HydA aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (1WUJ), von Nqo6 aus *Thermus thermophilus* (3iam) und von HoxK aus *R. eutropha* (3RGW) wurden der *RCSB Protein*-Datenbank entnommen. Versuchsweise Modellierung der 3D-Struktur von HoxY aus *R. eutropha* basierend auf den genannten Strukturen wurde mit *SWISS-MODEL* (swissmodel.expasy.org) durchgeführt. Die Kristallstrukturen und 3D-Modelle wurden mit *PyMOL 1.3* (Schrödinger, LLC, USA) dargestellt. Durch Einscannen oder Abfotografieren digitalisierte Bilder von Polyacrylamid- und Agarosegelen sowie von Nähragarplatten wurden mit *GIMP 2.6.8* (www.gimp.org) nachbearbeitet. Vektorgrafiken wurden mit *Inkscape 0.48* (www.inkscape.org) erstellt. Die Bearbeitung und Auswertung numerischer Daten erfolgte mit *Microsoft Office Excel 2007*. Die Ausarbeitung von Klonierungsstrategien sowie die Auswertung von Sequenzchromatogrammen erfolgten mit dem Sequenzeditor *ApE v1.17* (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

Ergebnisse

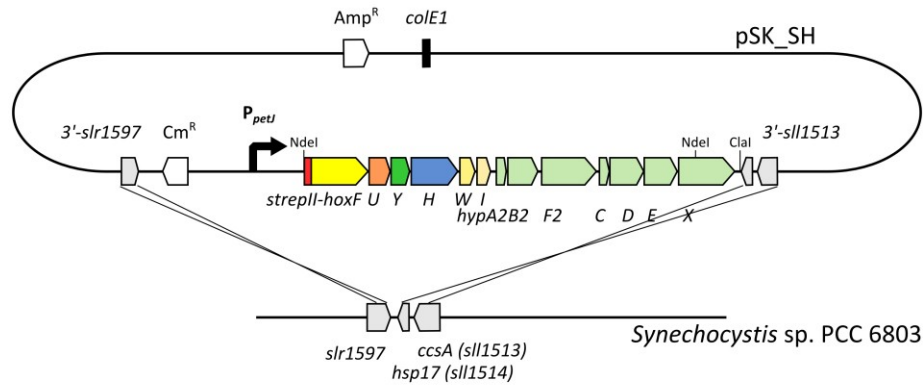
3.1 Ansätze zur heterologen Expression des „SH-Operons“ aus *R. eutropha* in Cyanobakterien

Für die Entwicklung eines zur lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion befähigten *In-vivo*-Hybridsystems aus Photosystem I (PSI) und löslicher Hydrogenase (SH) ist die heterologe Produktion einer sauerstofftoleranten Hydrogenase in Cyanobakterien eine essentielle Voraussetzung. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es deshalb, die heterologe Expression der SH aus *R. eutropha* in Cyanobakterien voranzutreiben. Zur Produktion von funktioneller SH sind neben den fünf Strukturgenen und dem eine spezifische Endopeptidase codierenden Gen *hoxW* sieben Maturationsfaktoren notwendig. Diese 13 Gene verteilen sich in *R. eutropha* auf zwei verschiedene Operons, wurden aber bereits in früheren Arbeiten zu einem künstlichen „SH-Operon“ zusammengefügt (Tanja Burgdorf, unveröffentlicht/ veröffentlicht in Lauterbach und Lenz, 2013) (Abb. 7). Ein um einen N-terminalen *Strep*-Tag II am *hoxF*-Gen erweitertes „SH-Operon“ (Oliver Lenz und Josta Hamann, unveröffentlicht) (Abb. 7) bildet die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.

3.1.1 Strategie zur genomischen Integration des „SH-Operons“ im *slr1514/slr1597*-Locus von *Synechocystis*

Erste Versuche zur heterologen Expression des „SH-Operons“ im *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp-Stamm (WT) und im Hydrogenase-negativen $\Delta hoxH$ -Stamm wurden von Alexander Schwarze im Rahmen seiner Doktorarbeit unternommen. Mit dem dort gewählten Ansatz, der eine Expression der SH-Gene unter Kontrolle des starken, quasi konstitutiven (lichtabhängigen) *psbAIII*-Promotors von einem Weitwirtsvektor aus vorsah, konnten jedoch keine SH-Proteine-produzierenden Transkonjuganten isoliert werden (A. Schwarze, 2010). Um dem durch die Produktion der endogenen Proteine möglicherweise verursachten negativen Selektionsdruck und der genetischen Instabilität eines 24,7 kb-großen Vektorsystems entgegenzuwirken, wurde von Alexander Schwarze vorgeschlagen das „SH-Operon“ unter Kontrolle des Cu^{2+} -reprimierbaren *petJ*-Promotors über homologe Rekombination (Tous *et al.*, 2001) ins Genom der *Synechocystis*-Stämme zu integrieren. Hierzu wurde von Alexander Schwarze und Caspar Schäfer das Plasmid pSK_SH (Abb. 5A) konstruiert.

A



B

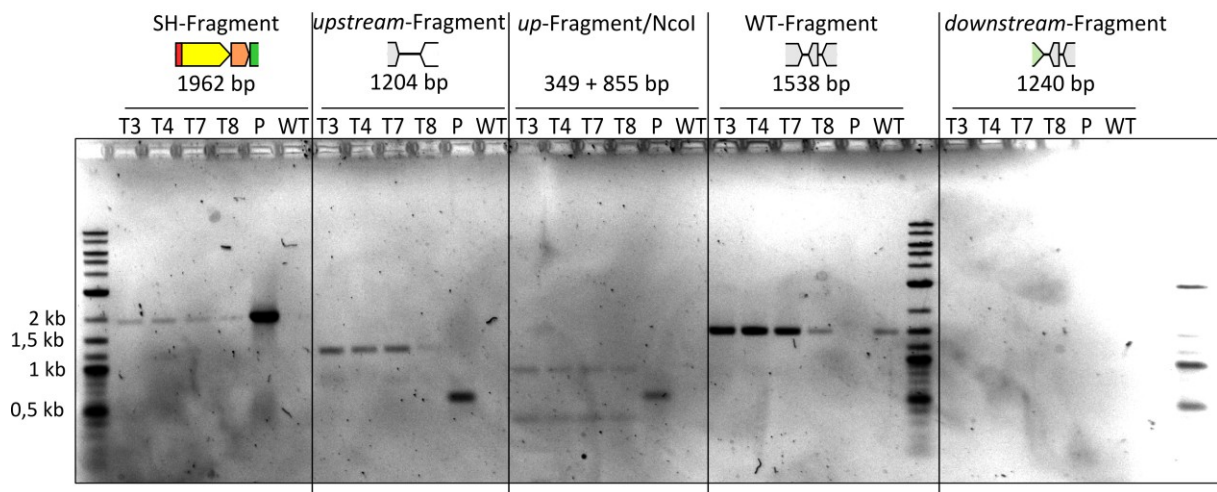


Abb. 5 (A) Strategie zur genomischen Integration des „SH-Operons“ in *Synechocystis* unter Verwendung des pSK_SH-Plasmids (B) Genotypisierung von vier Transformanten (T3, T4, T7, T8) im Vergleich zum *Synechocystis* Wildtyp-Stamm (WT) und dem pSK_SH-Plasmid (P) durch PCR.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mittels des pSK_SH-Plasmids eine Cm^R - $P_{pet}(Syn6803)\text{-strep-hoxFUYHWHIhypA2B2F2CDEXhoxA'}$ (ReH16)-Kassette über Rekombination gezielt in den *sll1514/slr1597*-Locus des WT und des ΔhoxH -Stamms von *Synechocystis* einzuführen. Als Kontrolle für die Transformation und die homologe Rekombination wurde der Ausgangsvektor pSK9 (Kuchmina *et al.*, 2012) ohne „SH-Operon“ verwendet. Nach einer Optimierung der Transformations- und Selektionsbedingungen konnten einige wenige Transformanten isoliert werden. Für die aus dem ΔhoxH -Stamm hervorgegangenen Transformanten war der Versuch, die Segregation des „SH-Allels“ bei Chloramphenicolkonzentrationen von mehr als $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ voranzutreiben, jedoch erfolglos. Die aus den Ansätzen des WT-Stamms erhaltenen Transformanten konnten teilweise bis zu einer Chloramphenicolkonzentration von $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ konditioniert werden. Die genetische Überprüfung dieser Transformanten ergab allerdings, dass keine vollständige Segregation des

„SH-Allels“ erzielt worden war (Abb. 5B). Weiterhin ließen sich zwar der modifizierte *upstream*-Bereich des Integrationslocus und Teile des „SH-Operons“ nachweisen, eine Amplifikation des zu erwartenden *downstream*-Bereichs des Integrationslocus war jedoch nicht möglich (Abb. 5B). Versuche unter dereprimierenden Cu^{2+} -Mangelbedingungen SH-Transkripte bzw. Proteine mittels *Real-Time*-PCR bzw. immunologisch nachzuweisen blieben erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass auch mit dieser Strategie keine stabile Übertragung des 13,8 kb-großen „SH-Operons“ in die *Synechocystis*-Stämme erreicht werden konnte.

3.1.2 Neue Strategien basierend auf flexibel einsetzbaren genetischen Bausteinen

3.1.2.1 Konstruktion der genetischen Bausteine

Nach den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen erfolglosen Versuchen zur heterologen Expression des „SH-Operons“ in *Synechocystis* und intensiven Literaturrecherchen wurden die im Folgenden aufgelisteten Ansatzpunkt für neue Strategien erarbeitet:

- Verwendung mehrerer kleiner Expressionskassetten, z. B. durch Teilung des „SH-Operons“ in Strukturgene (inkl. *hoxW*) und Maturationsfaktoren
- Verwendung von zwei Antibiotikaresistenzmarkern am Anfang und am Ende der Expressionskassette(n)
- Nutzung von stark regulierten Promotoren, die durch Zugabe eines Induktors aktiviert werden
- Verwendung alternativer cyanobakterieller Modellorganismen, z. B. *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942
- Positive Selektion auf die Integration der Expressionskassette(n) oder idealweise auf die Produktion funktioneller SH

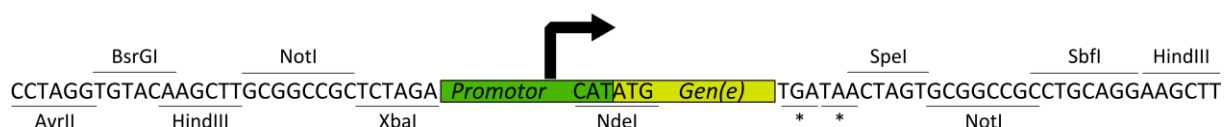
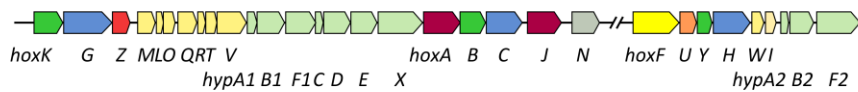


Abb. 6 Standardisiertes Design für flexibel einsetzbare „SH-Bausteine“. Dargestellt sind die Sequenzen der verwendeten *upstream*- und *downstream*-Linker der Expressionskassette. Die Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet.

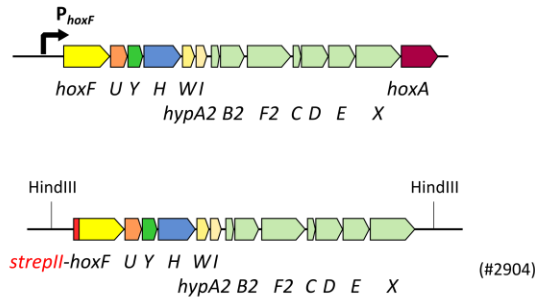
Um möglichst einfach verschiedene Strategien, die einen oder mehrere der genannten Punkte berücksichtigen, testen zu können, wurden zunächst flexibel einsetzbare genetische Bausteine entworfen. In Anlehnung an das von Tom Knight und Kollegen entwickelte BioBrick®-System (Knight, 2003) wurden hierzu standardisierte singuläre Restriktionsschnittstellen eingefügt, die den Austausch des Promotors sowie der *up*- und *downstream*-Bereiche der Expressionskassette erleichtern sollten. Unter Berücksichtigung der im „SH-Operon“ und weiteren Elementen, z. B. Promotoren, Resistenzkassetten und Vektoren, auftretenden Restriktionsschnittstellen wurde das in Abb. 6 dargestellte Design für genetische Bausteine entwickelt. Hier bei wurde auch darauf geachtet, eine Kompatibilität zu den in der Arbeitsgruppe verwendeten Konstrukten und dem BioBrick Assembly Standard 10 zu gewährleisten. Ausgehend von der *strep-hoxF*-codierenden Version des „SH-Operons“ wurden unter Eliminierung einer NdeI-Restriktionsschnittstelle im *hypX*-Gen drei Konstrukte entsprechend dieses Designs erstellt (Abb. 7) (siehe auch 2.4.1): 1. das komplette „SH-Operon“ (13,8 kb), 2. ein nur die Strukturgene und *hoxW* enthaltendes Operon (5,7 kb) und 3. ein nur die Maturationsfaktoren codierendes Operon (8,1 kb). Alle drei Expressionskassetten wurden hierbei zunächst unter Kontrolle des Ni²⁺-induzierbaren *nrsB*-Promotors aus *Synechocystis* gestellt. Zusätzlich wurde ein Baustein, der eine *Strep*-Tag II-tragende Version des *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP) codiert, als Kontrollkonstrukt etabliert (Abb. 7).

Ausgehend von diesen Grundbausteinen wurden zwei Ansätze zur heterologen Produktion der SH in Cyanobakterien verfolgt, die in den beiden folgenden Kapiteln (3.1.2.2 und 3.1.2.3) näher beschrieben werden. Eine vollständige Tabelle mit allen einfachen und zusammengesetzten Bausteinen, die für die heterologe Expression des „SH-Operons“ im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden, findet sich im Anhang (Tab. S3).

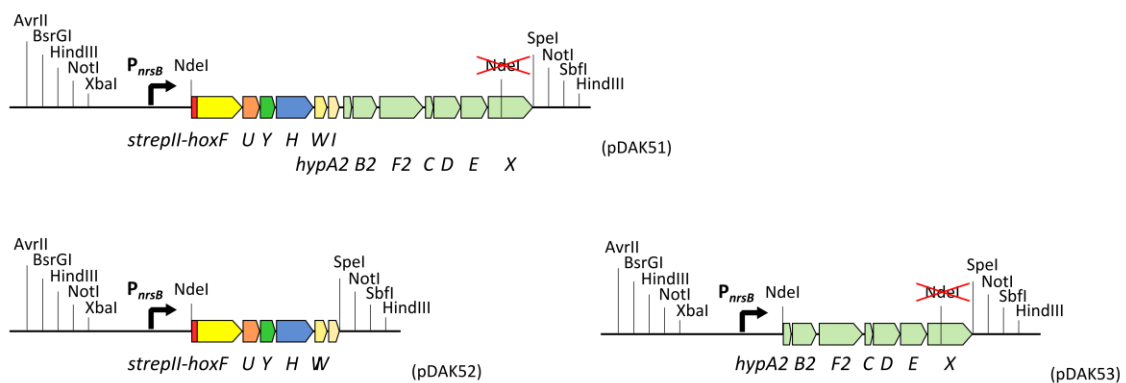
A Hydrogenasen-codierende Operons auf dem Megaplasmid pHG1 von *R. eutropha* H16 (ohne AH-codierendes Operon)



B Künstliches "SH-Operon" (Tanja Burgdorf) und "SH-Operon" mit *streII-hoxF* (Oliver Lenz/ Josta Hamann)



C Flexibel einsetzbare "SH-Bausteine" (diese Arbeit)



D Streptococcus-EYFP-codierendes Kontrollkonstrukt (diese Arbeit)

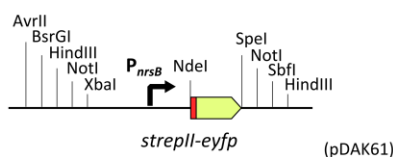


Abb. 7 **Natürliche und artifizielle Expressionskassetten für die heterologe Synthese der SH aus *R. eutropha*.**

3.1.2.2 Strategie zur plasmidbasierten Expression in verschiedenen cyanobakteriellen Spezies

Da in anderen Arbeiten *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 erfolgreich als Wirte für die heterologe Produktion von Proteinen, unter anderem von [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen, genutzt wurden (Weyman *et al.*, 2011, Ducat *et al.*, 2011a, Xu *et al.*, 2011), sollten die Versuche zur heterologen Expression des „SH-Operons“

hier auf diese cyanobakteriellen Modellorganismen ausgeweitet werden. Um parallel die verschiedenen cyanobakteriellen Wirte testen zu können, wurde ein Weitwirtsplasmid-basierter Ansatz gewählt, welcher in dieser Form bisher nicht für die *Synechococcus*-Spezies in der Literatur beschrieben wurde, und das „SH-Operon“ unter die Kontrolle des *psbAII*-Promotor aus *Synechocystis* gestellt. Für diesen Promotor ist bekannt, dass er auch in *S. elongatus* die Transkription initiiert (Iwaki *et al.*, 2006), während für *Synechococcus* sp. PCC 7002 keine Informationen hierzu vorlagen. Durch die Verwendung des für eine Chloramphenicol- (Cm) und eine Kanamycin- (Km) Resistenzkassette codierenden Vektors pVZ321 wurde zusätzlich die Möglichkeit geschaffen, auf beide Enden der SH-Expressionskassette zu selektieren (Abb. 8). Die hier vorgestellte Strategie sah vor, die eine SH-Expressionskassette tragenden pVZ321-Derivate, pDAK42o1 und pDAK42o2, sowie das *strep-eyfp*-tragende pVZ321-Derivat pDAK72o1 als Kontrolle in die WT-Stämme der *Synechococcus*-Spezies und in den Δ *hoxH*-Stamm von *Synechocystis* zu übertragen (Abb. 8).

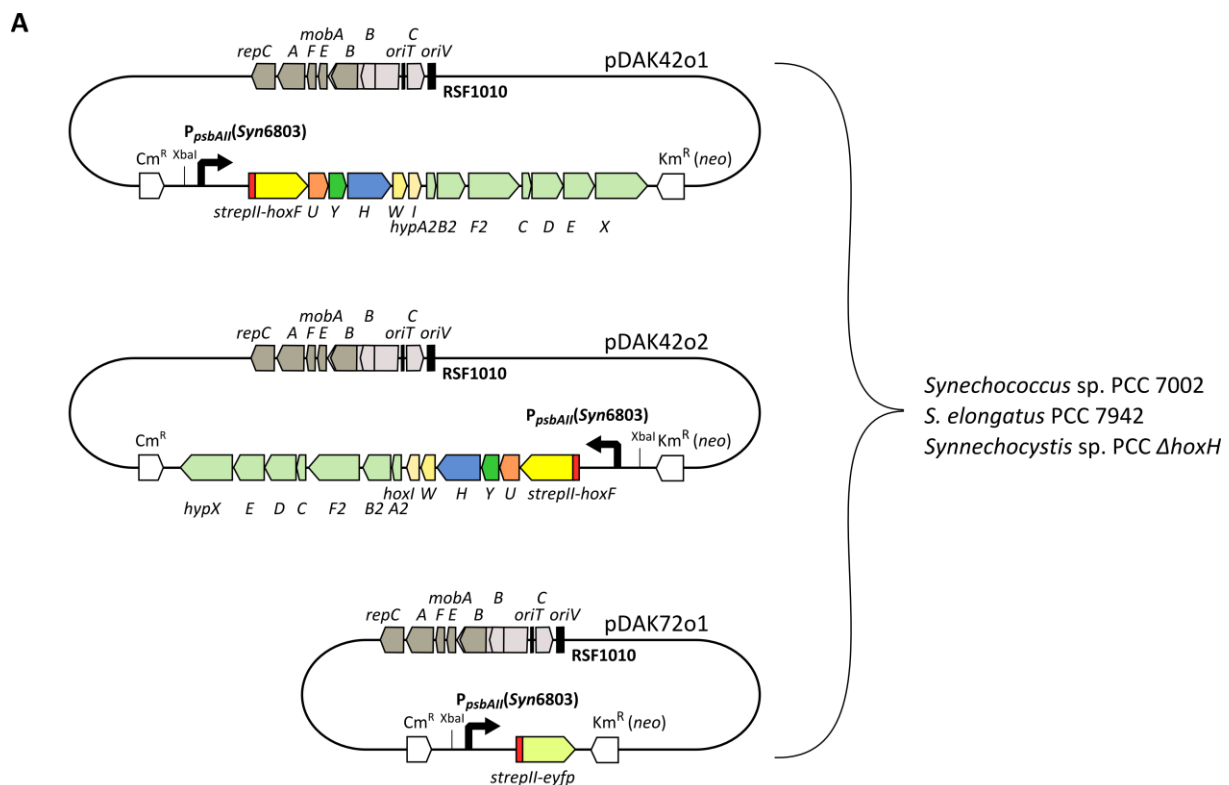


Abb. 8 Weitwirtsplasmid-basierte Strategie für die heterologe Expression der SH. Die dargestellten Plasmide sind Derivate des RSF1010(IncQ)-basierten Vektors pVZ321.

Da erste Versuche, diese Plasmide konjugativ in *Synechococcus* und *S. elongatus* zu übertragen, keine Transkonjuganten lieferten, wurde im Weiteren zur Optimierung des Konjugationsprotokolls nur das *strep-eyfp*-tragende Plasmid pDAK72o1 verwendet. Durch Reduktion der Antibiotikakonzentrationen auf 5 μ g ml⁻¹ Cm und 50 μ g ml⁻¹ Km für

Synechococcus bzw. auf $12 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cm und $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ Km für *S. elongatus* konnten unter Verwendung des Zweielternkreuzung-Protokolls Transkonjuganten erhalten werden. Eine Fluoreszenzmessung an positiv auf das *eyfp*-Gen getesteten Transkonjuganten zeigte, dass *Strep*-EYFP in den Transkonjuganten beider Spezies funktionell produziert wird (Abb. 9). Die geringere Fluoreszenz der *Synechococcus*-Transkonjuganten lässt auf eine schlechtere Expression des *strep-eyfp*-Gens, d. h. eine reduzierten Funktionalität des *psbAII*-Promotors aus *Synechocystis* in *Synechococcus* sp. PCC 7002, schließen. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass ein plamidbasierter Ansatz für die heterologe Produktion der SH in den *Synechococcus*-Spezies in Frage kommt und in zukünftigen Arbeiten getestet werden sollte.

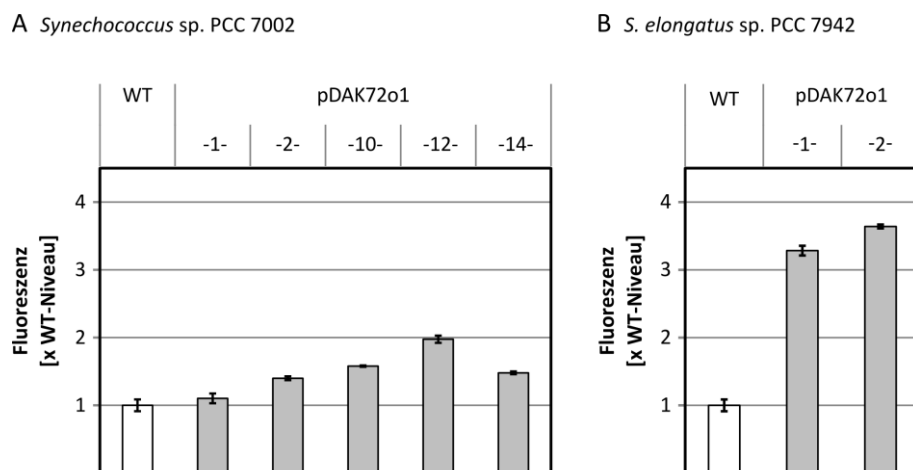
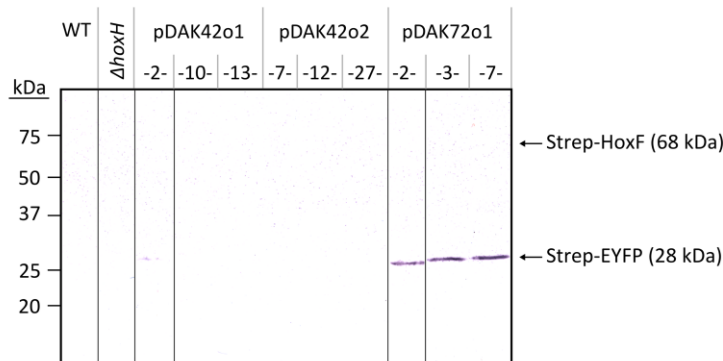


Abb. 9 EYFP-Fluoreszenz einzelner Transkonjuganten im Vergleich zum WT-Stamm. Die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 520 nm wurde im Fluoreszenzspektrometer (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm bestimmt und auf die optische Dichte der Kultur bei 750 nm bezogen.

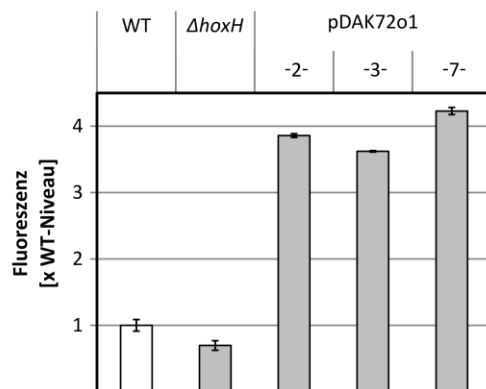
Da die *hoxH*-Deletion im hier verwendeten *Synechocystis*-Stamm $\Delta hoxH$ (Appel *et al.*, 2000) mit einer Km-Resistenzkassette assoziiert ist, konnten die aus diesem Stamm hervorgegangenen Transkonjuganten nur durch die Cm-Resistenz selektiert werden. Trotzdem gelang es, Transkonjuganten aller drei Plasmide zu isolieren, in denen sowohl das P_{psbAII} -*strep-hoxFUY*-Fragment als auch das *hypX*-Gen bzw. das P_{psbAII} -*strep-eyfp*-Fragment mittels PCR nachgewiesen werden konnten. Während sich die Produktion von funktionellem *Strep*-EYFP in den pDAK72o1-Transkonjuganten durch Fluoreszenzmessungen und Westernblot-Analyse nachweisen ließ (Abb. 10A+B), konnte für die pDAK42o1/o2-Transkonjuganten jedoch weder die Produktion des *Strep*-HoxF-Proteins noch eine durch funktionelle Hydrogenasekomplexe vermittelte Methylviologen(MV)-abhängige H_2 -Produktion gezeigt

werden (Abb. 10A+C). Auch nach einer dreistündigen Maturationsphase unter einer anaeroben Atmosphäre (2,5 % (v/v) CO₂/ 97,5 % (v/v) N₂) und Zugabe von 5 µM DCMU konnte keine Hydrogenaseaktivität nachgewiesen werden.

A Nachweis von Strep-Tag II-tragenden Proteinen



B EYFP-Fluoreszenz



C Hydrogenaseaktivität

		MV-abhängige H ₂ -Produktionsrate [nmol H ₂ min ⁻¹ OD ₅₅₀ ⁻¹]
WT		4,0 +/- 1,5
$\Delta hoxH$		< 0,1
pDAK42o1	-2-	< 0,1
	-10-	< 0,1
	-13-	< 0,1
pDAK42o2	-7-	< 0,1
	-12-	< 0,1
	-27-	< 0,1

Abb. 10 Charakterisierung der *Synechocystis*-Transkonjuganten. (A) *Strep*-EYFP aber nicht *Strep*-HoxF konnte immunologisch mit *Strep*-Tactin-Konjugat in den entsprechenden Transkonjuganten nachgewiesen werden. Es wurden Äquivalente von 0,2 OD₇₅₀-Einheiten pro Spur aufgetragen. (B) Erhöhte Fluoreszenz der EYFP-produzierenden Transkonjuganten wurde durch Messungen im Fluoreszenzspektrometer gezeigt (vgl. Abb. 9). (C) Eine Methylviologen(MV)-abhängige Wasserstoffproduktionsaktivität der mit TritonX100 lysierten Zellen konnte bei der gaschromatographischen Bestimmung nur für die WT-Kultur gezeigt werden.

Da hier gezeigt werden konnte, dass die Gene vorhanden und der Promotor unter den getesteten Bedingungen aktiv ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Transkriptstabilität ein Problem darstellt. Um diese zu verbessern, wurde zum einen das „SH-Operon“ mit einem Terminator versehen und zum anderen Konstrukte erstellt, in denen die *hyp*-Gene unter Kontrolle eines eigenen *psbAII*-Promotors stehen (Tab. S3). Ein Test dieser Konstrukte hinsichtlich ihrer Kapazität die heterologe SH-Produktion in Cyanobakterien zu vermitteln, ist ein Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten.

3.1.2.3 Strategie zur Integration der SH-Gene in den *nrsBAC*-Locus von *Synechocystis*

In dem 2009 von Liu und Curtiss veröffentlichten *Synechocystis*-Stamm SD102 (Liu und Curtiss, 2009) wurde der ein Ni^{2+} -Resistenzsystem codierende *nrsBAC*-Locus gegen ein Holin-codierendes Gen sowie eine Km^R -*sacB*-Kassette ausgetauscht (Abb. 11). Das *holin*-Gen, dessen Expression zur Selbstlysis der Zellen führt, steht dabei unter der Kontrolle des strikt regulierten, durch Ni^{2+} -induzierbaren *nrsB*-Promotors.

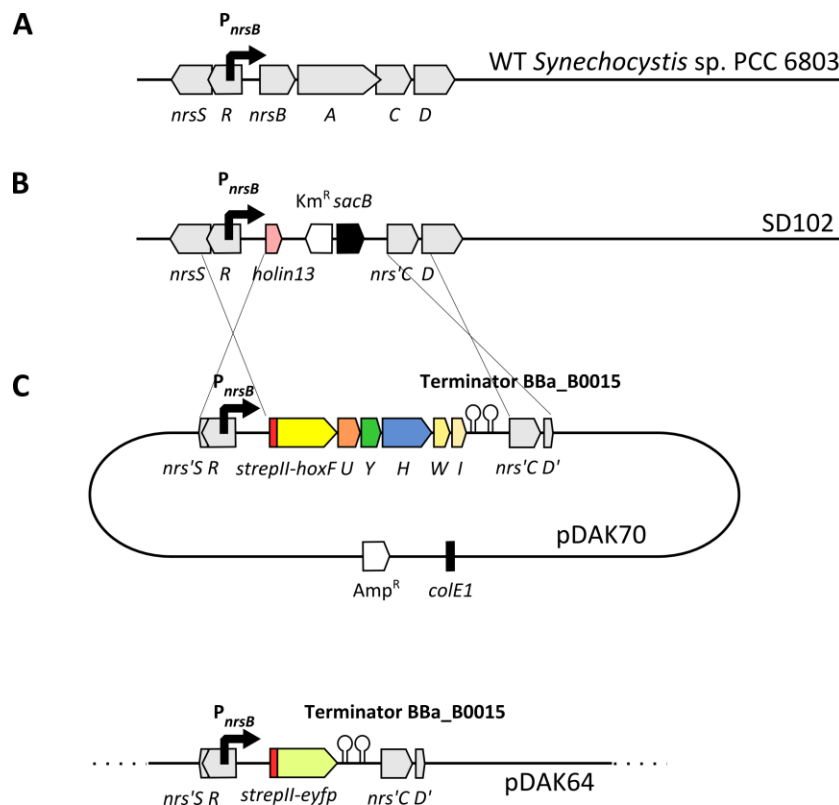


Abb. 11 Strategie zur Integration der SH-Expressionskassette in den *nrsBAC*-Locus von *Synechocystis*. (A) natürlicher *nrsBAC*-Locus (B) modifizierter *nrsBAC*-Locus des Stamms SD102 (Liu und Curtiss, 2009) (C) Plasmide zum Austausch der *holin*- Km^R -*sacB*-Kassette gegen eine SH-Expressionskassette (pDAK70) bzw. ein EYFP-codierendes Kontrollkonstrukt (pDAK64)

Dieser als SD102 bezeichnete Stamm bietet sich aus mehreren Gründen als Ausgangsstamm für die genomische Integration einer SH-Expressionskassette an. Zum einen stellt der Austausch des *sacB*- (und des *holin*-)Gens gegen eine beliebige Expressionskassette mit nicht zelltoxischen Genprodukten einen Selektionsvorteil für die entstehenden Klone dar. Durch Selektion auf Saccharose-haltigen Nähragarplatten lassen sich dabei markerfreie Stämme generieren. Zum anderen wird durch den *nrsB*-Promotor eine Produktion der SH-Proteine während des Selektionsprozess in Ni^{2+} -freiem Medium verhindert, so dass kein

Selektionsnachteil durch die Integration der SH-Gene auftreten kann. Die Nutzung von Ni^{2+} als Induktor ist außerdem vorteilhaft, da Ni^{2+} für die Produktion funktioneller SH benötigt wird. Zum Austausch der *holin*- Km^R -*sacB*-Kassette gegen eine Expressionskassette mit den Strukturgenen der SH bzw. eine Expressionskassette mit dem *strep-eyfp*-Gen wurden deshalb die Plasmide pDAK70 und pDAK64 konstruiert (Abb. 11C). Beide Expressionskassetten wurden mit einem *BioBrick*-Terminator aus dem *Registry of Standard Biological Parts* (part.igem.org) versehen. Um die Größe der SH-Expressionskassette zu reduzieren, sollten hier zunächst nur die Gene *hoxFUYHWI* transferiert werden. Die für die Maturation der Hydrogenase relevanten Gene *hypA2B2F2CDEX* sollten dann später in einer zweiten, plasmidcodierten Expressionskassette ergänzt werden.

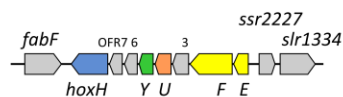
Durch die Transformation des SD102-Stamms mit den Plasmiden pDAK70 und pDAK64 konnten Saccharose-resistente Transformanten erzeugt werden. Ein Nachweis der zu erwartenden P_{nrsB} -*strep-hoxFUYHWI-term-nrs'CD'*- und P_{nrsB} -*strep-eyfp-term-nrs'CD'*-Loci war in diesen Transformanten jedoch nicht möglich. Weiterhin konnte auch nach Induktion mit Ni^{2+} keine EYFP-Produktion in den aus den Ansätzen mit dem pDAK64-Plasmid hervorgegangen Transformanten gezeigt werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Saccharose-Resistenz durch eine von den übertragenen Expressionskassetten unabhängige Modifikation des *sacB*-Gens, wie z. B. eine spontane Punktmutation, hervorgerufen wurde. In einem alternativen Ansatz wurden die Expressionskassetten mittels Derivaten des pLO3-Plasmids, pDAK71 und pDAK65 (siehe auch 2.4.1), durch Konjugation in den Stamm SD102 übertragen. Hierbei konnten jedoch keine Saccharose-resistenten Transformanten isoliert werden.

Da der Verlust der Saccharose-Sensitivität, wie hier beobachtet, auch unabhängig von der gewünschten Integration der Expressionskassette auftreten kann, erfordert dieser Ansatz insgesamt einen noch höheren Durchsatz an genotypisierten Saccharose-resistenten Transformanten. Eventuell könnte dabei durch die Verwendung von Ni^{2+} -haltigem Medium der Selektionsdruck zu Gunsten eines Austausches der P_{nrsB} -*holin*- Km^R -*sacB*- gegen die SH-Expressionskassette erhöht werden. Auch die Vergrößerung der homologen *upstream*- und *downstream*-Bereiche von 1 kb auf 3 kb könnte zur effizienteren Rekombination beitragen. Erste Plasmide für eine solche Erweiterung wurden bereits konstruiert (vgl. 2.4.1 und Tab. S3).

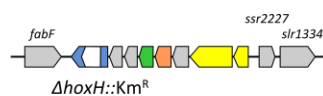
3.1.2.4 Erstellung einer $\Delta hoxEFU3Y67H::Spec^R$ -*sacB* Deletionsmutante in *Synechocystis*

In der Literatur sind zwei Hydrogenasedeletionsmutanten für *Synechocystis* beschrieben. Der hier verwendete Stamm $\Delta hoxH$ (Appel *et al.*, 2000) und ein markerfreier Stamm, in dem die das Hydrogenasemodul-codierenden Gene *hoxHY* vollständig eliminiert wurden (Pinto *et al.*, 2012) (Abb. 12A+B). Beide Stämme codieren jedoch das ebenfalls zur $NAD(P)^+$ -abhängigen Hydrogenase gehörende $NAD(P)H$:Akzeptor-Oxidoreduktase-Modul, welches bei einer heterologen Produktion der SH aus *R. eutropha* interferieren könnte. Zudem schränkt die Kanamycin-Resistenz des $\Delta hoxH$ -Stamms die Möglichkeiten zur heterologen Expression des „SH-Operons“ ein (siehe 3.1.2.2).

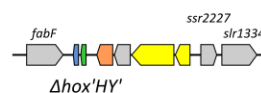
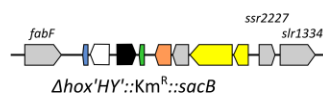
A Hydrogenase-codierendes Operon in *Synechocystis* sp. PCC 6803



B Partielle Hydrogenasedeletionsmutanten

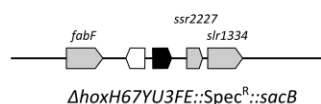


(Appel *et al.*, 2000)



(Pinto *et al.*, 2012)

C Vollständige Hydrogenasedeletionsmutante (diese Arbeit)



erzeugt mit:

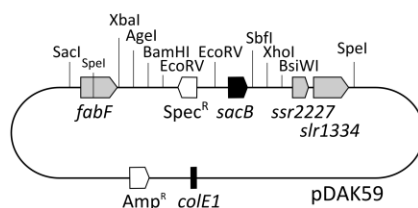


Abb. 12 Partielle und vollständige Deletionen des Hydrogenase-codierenden Operons in *Synechocystis*

Um diesen Nachteilen zukünftig entgehen zu können und auch in schon bestehende Stämme, wie beispielsweise den Stamm SD102 (siehe 3.1.2.3), gezielt Hydrogenasedeletionen einfügen zu können, wurde eine Deletionskassette konstruiert mit der sich das komplette Hydrogenaseoperon inklusive der noch nicht näher charakterisierten offenen Leserahmen -

ORF3, 6 und 7 - gegen einen Marker austauschen lässt, der aus einer Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette (Spec^R) und dem *sacB*-Gen besteht (Abb. 12C). Die Funktionalität des hierfür konstruierten Vektors pDAK59 (siehe auch 2.4.1) wurde am *Synechocystis* WT-Stamm getestet.

Die durch Transformation mit dem pDAK59-Plasmid erhaltene Spectinomycin-resistente Einzelkolonie wurde segregiert, bis keine Hydrogenase-spezifischen Gene mehr durch PCR nachgewiesen werden konnten (Abb. 13A). Zusätzlich wurde auch der neu entstandene $\Delta hoxEFU3Y67H::Spec^R-sacB$ -Locus mittels PCR überprüft (Abb. 13A). Der so isolierte Stamm wurde als $\Delta hox59\alpha$ benannt. Im Enzymassay mit TritonX100[®]-lysierten Zellen konnte gezeigt werden, dass er wie der $\Delta hoxH$ -Stamm keine MV-abhängige H₂-Produktionsaktivität besitzt (Abb. 13C). Außerdem wurden seine Spectinomycin-Resistenz sowie seine Saccharose-Sensitivität im Plattentest bestätigt (Abb. 13B).

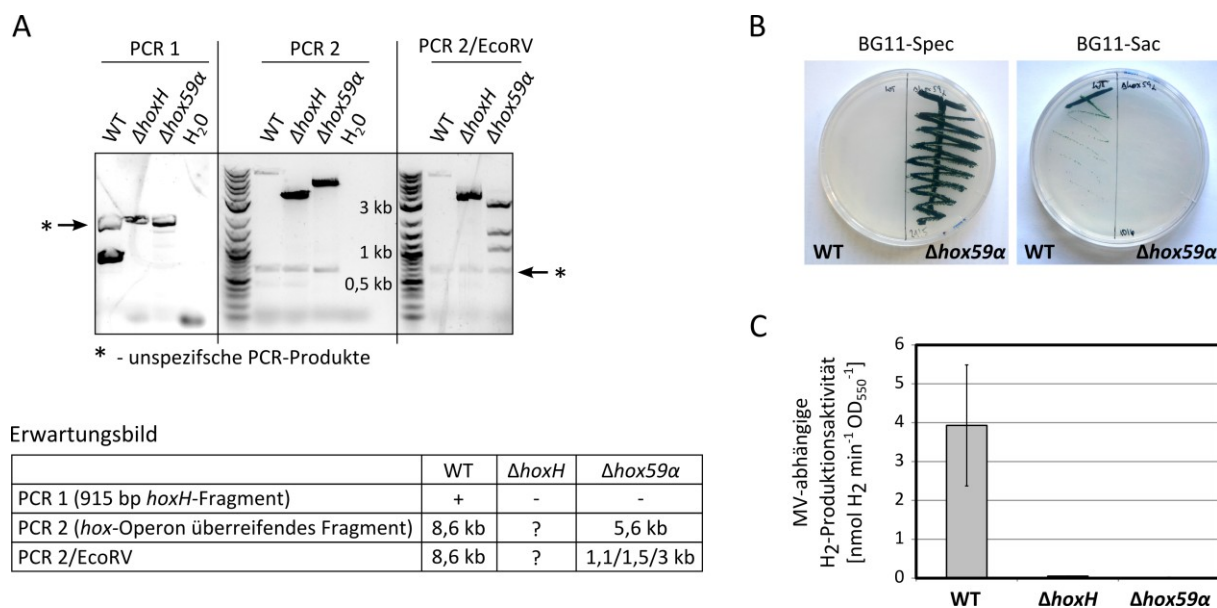


Abb. 13 Charakterisierung des neuen Deletionsstamms $\Delta hox59\alpha$. (A) Durch PCR mit den Primern ka102b/ka103b (PCR 1) und ka104/ka105 (PCR 2) konnten die erwarteten Genotypen bestätigt werden. (B) Anzucht des WT- und des $\Delta hox59\alpha$ -Stamms auf selektivem Medium (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Spectinomycin bzw. 5 % (w/v) Saccharose) (C) Die mit TritonX100-lysierten Zellen des $\Delta hox59\alpha$ -Stamms zeigen keine Methylviologen(MV)-abhängige H₂-Produktionsaktivität bei der gaschromatographischen Bestimmung.

Damit konnte gezeigt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmid pDAK59 eine Deletion des kompletten Hydrogenasesoperons in *Synechocystis*-Stämme ermöglicht. In folgenden Projekten könnte die Spec^R-*sacB*-Kassette in dem hier etablierten $\Delta hox59\alpha$ -Stamm unter Verwendung von Derivaten des pDAK59-Plasmids durch markerfreie Elemente, wie z. B. eine SH-codierende Expressionskassetten, ersetzt werden (Abb. 12C).

3.2 Untersuchungen zur Funktionalität von SH-PSI-Hybridkomplexen

Eine Kopplung der durch den cyanobakteriellen Photosynthese-Apparat katalysierten, lichtgetriebenen Wasserspaltung mit der Wasserstoffproduktion O_2 -toleranter Hydrogenasen kann durch einen direkten Transfer von energiereichen Elektronen vom F_B -Cluster des Photosystem I (PSI) auf einen der Eisenschwefelcluster der Hydrogenase erreicht werden. Dazu müssen die beiden Kofaktoren in eine für den effizienten Elektronentransfer notwendige Distanz von unter 15 Å gebracht werden. Die dafür notwendige Zusammenlagerung von Hydrogenase und PSI kann durch die Fusion peripherer PSI-Untereinheiten an die Hydrogenase erzwungen werden. Dieses Prinzip wurde in früheren Arbeiten mit der membrangebundenen Hydrogenase (MBH) aus *R. eutropha* demonstriert (Ihara *et al.*, 2006, Schwarze *et al.*, 2010, Krassen *et al.*, 2009). So konnte gezeigt werden, dass sich eine MBH-PsaE-Fusion mit PsaE-freiem PSI zu einem zur lichtabhängigen H_2 -Produktion befähigten Hybridkomplex zusammenlagert. Da für *In-vivo*-Anwendungen in cyanobakteriellen Wirtssystemen die lösliche Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha* das erfolgversprechendere System darstellt, wurden von Alexander Schwarze im Rahmen seiner Doktorarbeit Produktionsstämme für SH-Derivate etabliert (A. Schwarze, 2010, S. 92ff). Diese codieren Fusionsproteine der SH-Untereinheit HoxY mit den peripheren PSI-Untereinheiten PsaE und PsaD sowie mit dem Ferredoxin PetF. BlueNative-PAGE-Experimente hatten gezeigt, dass sich die SH^{PsaE} - und SH^{PsaD} -Derivate mit den entsprechenden PSI-Derivaten zu Hybridkomplexen zusammenlagern (A. Schwarze, 2010, S. 97). Die funktionelle Charakterisierung dieser Hybridkomplexe war ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit.

3.2.1 Reinigung der Einzelkomponenten

3.2.1.1 Reinigung von PSI-Derivaten aus *Synechocystis*

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Decahistidin-Tag (His10-Tag)-tragendes wildtypisches und PsaE-freies PSI sowie PsaD-freies PSI ohne His10-Tag aus den entsprechenden *Synechocystis*-Stämmen (WT PSI-His, $\Delta psaE$ PSI-His und $\Delta psad$ - vgl. Tab. 2) gereinigt. Das hierfür verwendete Protokoll entsprach dem in der Dissertation von Alexander Schwarze beschriebenen Verfahren (A. Schwarze, 2010, S. 61ff) mit dem Unterschied, dass die Anzucht der Zellen im Photobioreaktor (Kultivationssystem phototropher Mikroorganismen –LWS-05-, IGV GmbH, Nuthetal, Deutschland) erfolgte (siehe auch 2.2.4). So konnten mit einem zweistufigen Reinigungsprotokoll aus Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie und Saccharosegradient die trimeren Formen des His10-PSI-WT

und des His10-PSI Δ PsaE mit Sauerstoffreduktionsaktivitäten von 1000-1300 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1}$ Chlorophyll (Chl) h^{-1} isoliert werden. Die monomere Form des PsaD-freien PSI, die durch die Auftrennung der solubilisierten Thylakoidmembran im Saccharosegradienten erhalten wurde, wies ebenfalls eine Sauerstoffreduktionsaktivität in der Größenordnung von 1200 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1}$ Chl h^{-1} auf.

3.2.1.2 Reinigung von SH-Derivaten aus *R. eutropha*

Das Protokoll zur Reinigung der wildtypischen SH wurde im Rahmen jüngerer Arbeiten (L. Lauterbach, 2013) optimiert. Wesentliche Veränderungen ergaben sich dabei in der Zellanzucht und in dem für den Zellaufschluss und die Affinitätschromatographie verwendeten Puffersystem. Die Zellanzucht erfolgt nach dem neuen Protokoll in zu 80 % (v/v) mit $\text{F}_{0,05}\text{G}_{0,4}\text{N}$ -Medium gefüllten Schikanekolben (siehe auch 2.2.3). So wird eine Expression und Reifung der SH unter mikroaeroben Bedingungen forciert. Weiterhin enthält das optimierte Medium Spurenelementlösung SL6- Ni^{2+} und ZnCl_2 . Für die Aufarbeitung der SH wird im modifizierten Protokoll NAD^+ als Oxidationsmittel der SH dem Aufschlusspuffer zugesetzt. Außerdem enthalten alle für die Aufarbeitung verwendeten Puffer 5 % Glycerin jedoch keine DNaseI, was zur Stabilisierung des Proteinkomplexes beiträgt.

Die etablierten Modifikationen des Reinigungsprotokolls wurden hier auf die Reinigung der SH-Derivate übertragen. So konnten der SH^{PsaE} -, SH^{PsaD} - und SH^{PetF} -Komplex in WT-ähnlichen Mengen gereinigt werden (Abb. 14).

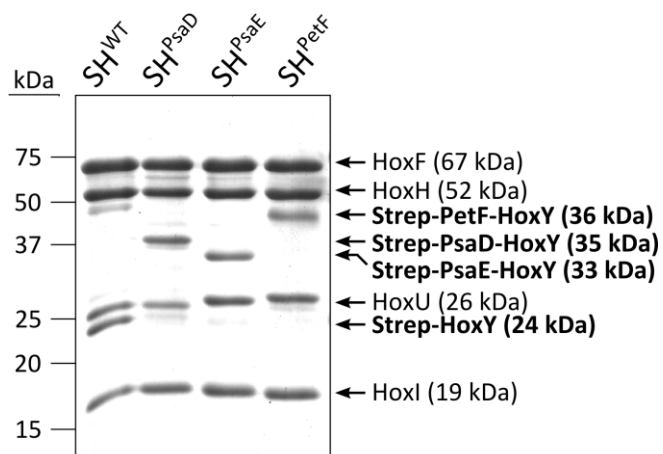


Abb. 14 SH-Derivate gereinigt über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie. Je 5 μg der gereinigten Proteinkomplexe wurden im 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht.

Tab. 5 Funktionelle Charakterisierung der SH-Derivate. Die NAD^+ -Reduktionsaktivität wurde photometrisch bestimmt. Die Methylviologen (MV)-abhängige H_2 -Produktion wurde gaschromatographisch bestimmt. Angegeben ist die Varianz der Aktivitäten verschiedener Präparationen. Ein Unit (1 U) entspricht $1 \mu\text{mol NADH}$ bzw. $1 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1}$.

	H_2-abhängige NAD^+-Reduktionsaktivität^[1]		MV-abhängige H_2-Produktionsaktivität	
	U mg^{-1} SH	U nmol^{-1} SH	U mg^{-1} SH	U nmol^{-1} SH
SH^{WT}	71-141	15-29	10-17	2-4
SH^{PsaD}	21	5	4	1
SH^{PsaE}	61-114	13-25	6-14	1-3
SH^{PetF}	85	18	12-17	3-4

^[1] In Gegenwart von 1 mM DTT und 1 μM FMN

Die für die SH-Komplexe bestimmten NAD^+ -Reduktions- und MV-abhängigen H_2 -Produktionsaktivitäten (siehe Tab. 5) waren vergleichbar mit denen der Präparationen von Alexander Schwarze (A. Schwarze, 2010, S. 96).

3.2.2 Biochemische Charakterisierung in *In-vitro*-Experimenten

3.2.2.1 Heterologe Produktion von Cytochrom c_6 aus *Synechocystis* in *E. coli*

Cytochrom c_6 (Cyt c_6) ist einer der natürlichen Elektronendonatoren des PSI in *Synechocystis*. In *In-vitro*-Studien am PSI von *Thermosynechococcus elongatus* wurde das entsprechende Cyt c_6 als effizienter Elektronenüberträger zwischen reduziertem Natriumascorbat und dem PSI eingesetzt (Iwuchukwu *et al.*, 2010). Da bis dato mit artifiziellen Elektronenmediatoren keine lichtabhängige H_2 -Produktionsaktivität für die SH-PSI-Hybridkomplexe gezeigt werden konnte (vgl. A. Schwarze, 2010, S. 97), sollte dieses System nun für die *In-vitro*-Charakterisierung der Hybridkomplexe verwendet werden. Dazu wurden größere Mengen des Cyt c_6 von *Synechocystis* benötigt, welches deshalb heterolog in *E. coli* produziert werden sollte.

In einem ersten Ansatz wurde hierzu das pDAK1-Plasmid konstruiert, welches das vollständige Cyt c_6 -Apoprotein codierende *petJ*-Gen aus *Synechocystis* mit C-terminalem His6-Tag enthält (vgl. 2.4.2). Aus Transformanten von *E. coli* BL21(DE3) mit diesem Plasmid konnten jedoch nur sehr geringe Mengen an maturem Cyt c_6 erhalten werden. Durch Umsetzung der bei Harris *et al.*, 2010 beschriebenen Punkte zur Optimierung der Produktion und Reifung von Cytochromen in *E. coli* konnte die Ausbeute an Cyt c_6 jedoch deutlich

gesteigert werden. Dazu wurde erstens die den Sec-abhängigen Export ins Periplasma vermittelnde *Leader*-Peptid-Sequenz des Cyt *c*₆ durch eine *E. coli*-eigene *Leader*-Peptid-Sequenz ausgetauscht. Das hierfür konstruierte Plasmid pDAK3 codiert eine Chimäre aus dem *pelB*-*Leader* von *E. coli* mit dem *Leader*-freien *petJ*-Gen aus *Synechocystis*. Neben dem nach Abspaltung des *Leader*-Peptids N-terminal gelegenen His10-Tag enthält das rekombinante Cyt *c*₆ auch noch einen C-terminalen FLAG-Tag (vgl. 2.4.2). Zweitens wurde ein weiteres die Cytochrom *c*-Maturationsfaktoren aus *E. coli* (*ccmA-H*) codierendes Plasmid, pEC86, in den BL21(DE3)-Expressionsstamm eingebracht. Ein dritter Punkt zur Förderung der Cyt *c*₆-Reifung in *E. coli* betraf die Anzuchtbedingungen. So wurden nach einer Zellproliferationsphase unter Standardbedingungen (37 °C, 220 rpm) die Expression des *petJ*-Derivats mit einer IPTG-Konzentration von nur 0,1 mM induziert und während der 40-stündigen Reifungsphase durch Inkubation bei 30 °C und nur 80 rpm microaerobe Bedingungen für die Reifung des Cytochroms geschaffen.

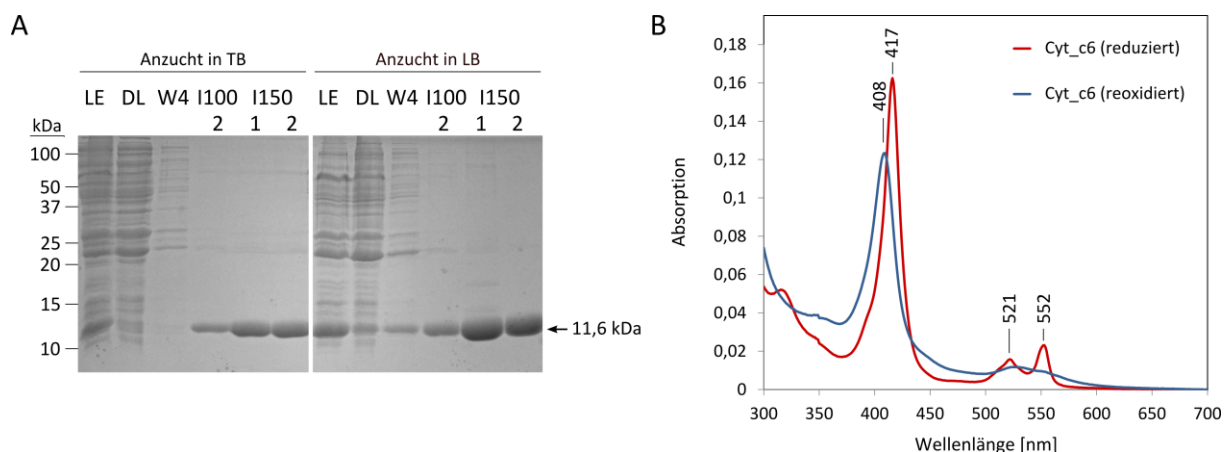


Abb. 15 Reinigung und UV-vis-spektroskopische Charakterisierung des rekombinanten Cyt *c*₆. (A) Das heterolog in *E. coli* produzierte His10-Cyt *c*₆-FLAG-Protein (11,6 kDa) wurde über Ni²⁺-NTA-Chromatographie gereinigt. Die Reinigungen aus in verschiedenen Medien (TB, LB) angezogenen Zellen wurden verglichen. Je 7,5 µl des löslichen Extrakts (LE) und des Durchlaufs (DL) sowie 15 µl der letzten Waschfraktion (W4) und der Eluatsfraktionen mit 100 bzw. 150 mM Imidazol (I100/I150) wurden in einem 16 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und die enthaltenen Proteine durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. (B) Zur Charakterisierung des Cyt *c*₆ wurden UV-vis-Spektren im Bereich von 300 bis 700 nm aufgenommen. Eine Cyt *c*₆-Lösung (1,2 µM) wurde durch Zugabe von Natriumdithionit reduziert und durch anschließende Zugabe von Ammoniumpersulfat reoxidiert.

Durch diese Optimierung des Expressionstamms und der Anzuchtbedingungen konnten aus 400 ml Kultur bis zu 3 mg des Cyt *c*₆ aus *Synechocystis* gereinigt werden (Abb. 15). Eine von Harris *et al.*, 2010 vorgeschlagene Anpassung des Anzuchtmediums, die die Verwendung von Terrific Broth (TB) statt LB-Medium vorsah, zeigte hier keinen weiteren positiven Effekt auf

die Proteinausbeute (siehe Abb. 15). Mittels UV-vis-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das gereinigte Cyt c_6 reversibel reduziert werden kann (Abb. 15).

Das so gereinigte, redoxaktive Cyt c_6 konnte somit als Elektronenmediator in *In-vitro*-Experimenten mit dem PSI eingesetzt werden.

3.2.2.2 Einsatz von Cytochrom c_6 als Elektronendonator für PSI-Derivate

Standardmäßig werden zur Charakterisierung der PSI-Komplexe Elektronen hohen Potentials mit Hilfe des Elektronenmediators DCPIP (2,6-Dichlorphenolindophenol) von Natriumascorbat auf das PSI übertragen. Dort werden die Elektronen durch Lichtenergie auf ein höheres Energieniveau angehoben (niedriges Potential) und mittels Methylviologen auf O_2 übertragen. Die Reduktion des O_2 wird dabei amperometrisch verfolgt (siehe auch 2.7.1.1). Um zu testen, in welchen Konzentrationen der natürliche Elektronendonator Cyt c_6 für einen effizienten Elektronenübertrag auf das PSI eingesetzt werden muss, wurde hier der Sauerstoffreduktionsassay insoweit verändert, dass der Elektronenmediator DCPIP durch das heterolog produzierte Cyt c_6 (3.2.2.1) ersetzt wurde.

Tab. 6 O_2 -Reduktionsaktivitäten in Abhängigkeit von Natur und Konzentration des eingesetzten Elektronenmediators

	O_2 -Reduktionsaktivität [$\mu\text{mol } O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$]
ohne Elektronenmediator [*]	39 ± 1
4 μM DCPIP [*]	50 ± 5
40 μM DCPIP [*]	128 ± 53
400 μM DCPIP [*]	679 ± 41
800 μM DCPIP [*]	1155 ± 80
3,6 μM Cyt c_6 ^{**}	1203 ± 37
7,1 μM Cyt c_6 ^{**}	1867 ± 106
14,2 μM Cyt c_6 ^{**}	2442

^{*} gemessen mit 15 nM PsAE-freiem PSI Trimer (das entspricht 45 nM PSI-Reaktionszentren)

^{**} gemessen mit 11 nM PsAE-freiem PSI Monomer

Während in Gegenwart von 4 μM DCPIP die O_2 -Reduktionsaktivität kaum über der Hintergrundaktivität ohne Elektronenmediator lag, konnte in Gegenwart von 3,6 μM Cyt c_6 eine Reduktionsaktivität $\sim 1200 \mu\text{mol } O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ gemessen werden (Tab. 6). Dies entspricht der O_2 -Reduktionsaktivität des PSI unter Standardbedingungen (800 μM DCPIP).

Durch Erhöhung der Cyt c_6 -Konzentration konnte eine weitere Steigerung der O_2 -Reduktionsaktivität erreicht werden (Tab. 6). Eine Substratsättigung konnte in dem getesteten Bereich von 3,6-14,2 μM Cyt c_6 nicht beobachtet werden. Als Kompromiss zwischen Substratsättigung und Verfügbarkeit an heterolog produziertem Cyt c_6 wurden in den folgenden Experimenten zur Charakterisierung des SH-PSI-Hybridkomplexes 25 μM Cyt c_6 eingesetzt.

3.2.2.3 Optimierung des Puffersystems hinsichtlich der maximalen Aktivitäten der Einzelkomponenten

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen für die SH wurden die heterohexamere Form (mit 2 Kopien von HoxI) und die heterotetramere Form (ohne HoxI) der Wildtyp-SH wie unter 2.5.3 beschrieben gereinigt. Zunächst wurde mit dem einfach durchzuführenden und gut reproduzierbaren NAD^+ -Reduktionsassay (2.7.2.1) die Langzeitstabilität sowie die Aktivität in verschiedenen Puffersystemen für beide SH-Varianten getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der SH-Komplexe bei Lagerung in Gegenwart 5 % (v/v) Glycerin bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum mehr als 24 Monaten stabil bleibt (Abb. 16).

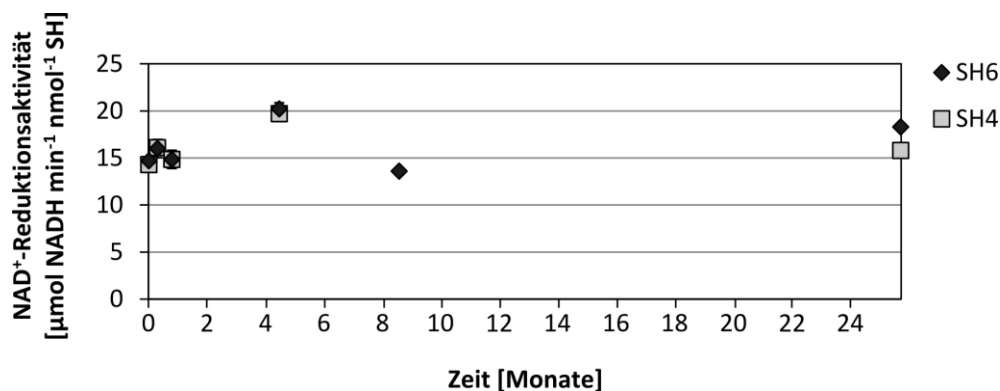


Abb. 16 Langzeitstabilität der bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten SH-Komplexe. Der heterohexamere und heterotetramere SH-Komplex (SH6 bzw. SH4) wurden am Tag der Reinigung aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die Lagerung erfolgte in 50 mM K- PO_4 (pH 7,1) mit 5 % (v/v) Glycerin. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität in 50 mM TrisHCl (pH 8,0) mit 1,8 μM FMN und 0,6 mM DTT bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Stoffumsätze auf die Zahl der SH-Komplexe bezogen.

Die NAD^+ -Reduktionsaktivitäten wurden in verschiedenen Puffersystemen bestimmt unter anderem in den standardmäßig für die Aktivitätsmessungen an der SH bzw. dem PSI verwendeten Puffern (Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass die SH-Komplexe außer in dem

standardmäßig für die SH verwendeten TrisHCl-Puffer auch in K-PO₄-Puffer, in mit KOH eingestelltem HEPES-Puffer und in PSI-Puffer (30 mM HEPES-KOH (pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM) gute Aktivitäten besitzen. Im Bereich zwischen pH 7,5 und pH 8,5 hatte der pH-Wert dabei nur einen geringen Einfluss auf die SH-Aktivität (Abb. 17). Interessanterweise wurde nur in dem den heterohexameren SH-Komplex stabilisierenden K-PO₄-Puffer (50 mM, pH 7,0) ein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Formen der SH beobachtet (Abb. 17). In diesem Puffer zeigt der heterotetramere SH-Komplex eine höhere Aktivität als die heterohexamere Form der SH. Möglicherweise dissoziiert der heterohexamere SH-Komplex in allen anderen Puffersystemen in den HoxFUYH-Komplex und freie HoxI-Untereinheiten, so dass dort effektiv nur die Aktivitäten des heterotetrameren SH-Komplexes bestimmt wurden. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, wirken sich Na⁺-Ionen negativ auf die NAD⁺-Reduktionsaktivität der SH aus (Keefe *et al.*, 1995), was hier durch die Messungen in mit NaOH-eingestelltem HEPES-Puffer bestätigt werden konnte (Abb. 17).

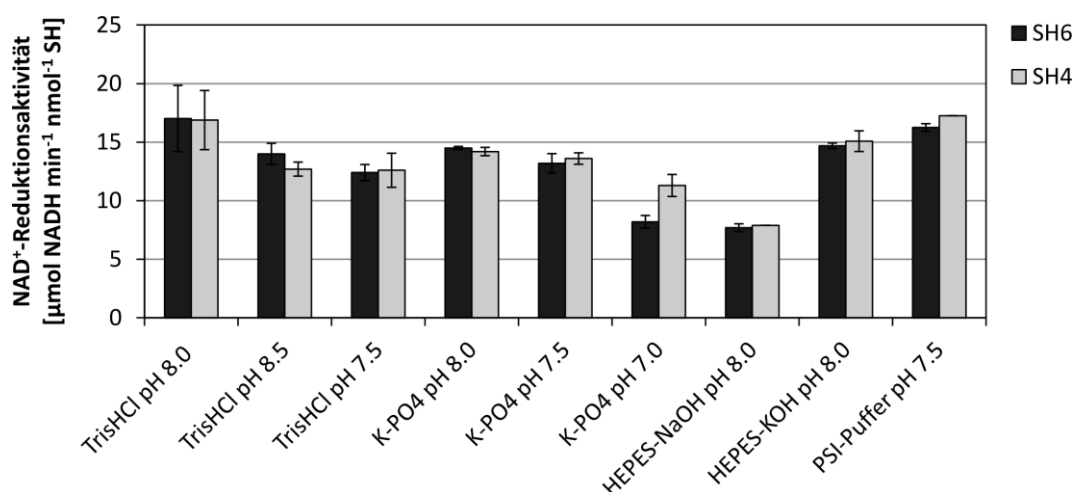


Abb. 17 H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität in verschiedenen Puffersystemen. Aktivitäten des heterohexameren und heterotetrameren SH-Komplexes (SH6 bzw. SH4) wurden jeweils in 50 mM Puffer mit 1,8 μM FMN und 0,6 mM DTT bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Stoffumsätze auf die Zahl der SH-Komplexe bezogen. Der PSI-Puffer enthielt 30 mM HEPES-KOH (pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM.

Da im SH-PSI-Hybridkomplex besonders die Fähigkeit der SH zur H⁺-Reduktion von Interesse ist, wurde für eine Auswahl der Puffersysteme auch die MV-abhängigen H₂-Produktionsaktivitäten der SH-Komplexe bestimmt (Abb. 18). Wie zu erwarten konnte dabei die höchste H₂-Produktionsaktivität von 3 $\mu\text{mol H}_2 \text{min}^{-1} \text{nmol}^{-1} \text{SH}$ bei einem niedrigen pH-Wert, d. h. einer hohen Konzentration an H⁺-Ionen, beobachtet werden (Abb. 18). Die

Aktivität des heterotetrameren SH-Komplexes in K-PO₄-Puffer (50 mM, pH 7,0) war erneut höher als die des heterohexameren Komplexes (Abb. 18). Der Einfluss von Na⁺-Ionen auf die H₂-Produktionsaktivität der SH konnte hier nicht untersucht werden, da das im Versuchsansatz verwendete Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) nur als Natriumsalz erhältlich ist. In den weiterführenden Experimenten wurde Na⁺ jedoch, soweit dies möglich war, in den Reaktionsansätzen vermieden. Im Hinblick auf Temperatur- und pH-Wert-Toleranz der SH wurden die im Folgenden verwendeten Versuchsbedingungen auch an die Beobachtungen aus der Doktorarbeit von Juliane Ratzka (J. Ratzka, 2011) angepasst.

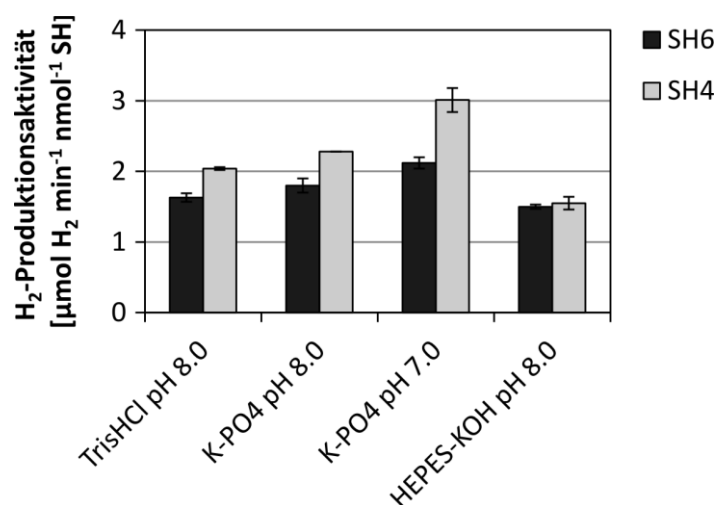


Abb. 18 MV-abhängige H₂-Produktionsaktivität in verschiedenen Puffersystemen. Aktivitäten des heterohexameren und heterotetrameren SH-Komplexes (SH6 bzw. SH4) wurden jeweils in 50 mM Puffer mit 1,8 μM FMN und 0,6 mM DTT gaschromatographisch bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Stoffumsätze auf die Zahl der SH-Komplexe bezogen.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen für den PSI-Komplex wurde die O₂-Reduktionsaktivität des PsaE-freien PSI-Trimerkomplexes in verschiedenen Puffersystemen untersucht. Neben dem standardmäßig verwendeten PSI-Puffer stellte sich dabei 20 mM K-PO₄-Puffer (pH 7,0) mit 10 mM MgCl₂ und 0,03 % (w/v) DDM als ein für das PSI geeignetes Puffersystem heraus (vgl. Abb. 19). Die Löslichkeitsgrenze ließ für diesen Puffer keinen Zusatz von CaCl₂ zu. Der Zusatz von MgCl₂ war jedoch für hohe und stabile Aktivitäten des PSI essentiell (vgl. Abb. 19). In dem in früheren Arbeiten für Aktivitätsmessungen am PSI verwendeten HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,5) mit 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 0,03 % (w/v) DDM konnte hier nur eine um 50 % reduzierte O₂-Reduktionsaktivität bestimmt werden (Abb. 19).

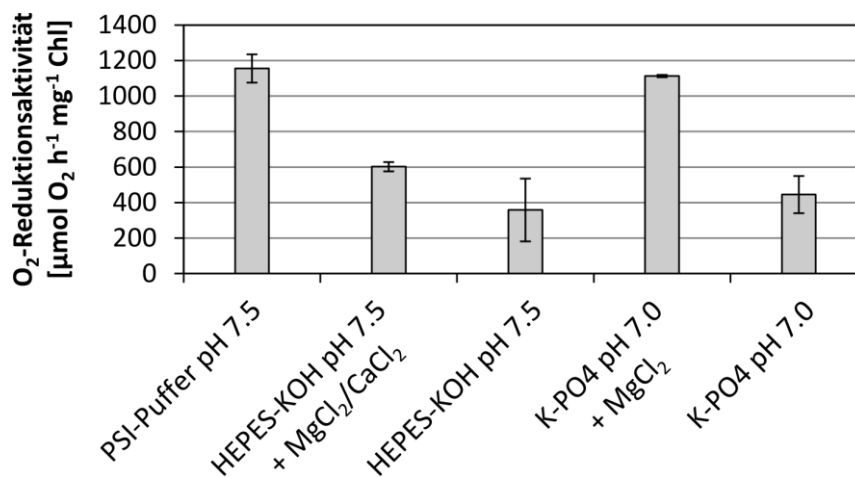


Abb. 19 O₂-Reduktionsaktivität des PSI-Komplexes in verschiedenen Puffersystemen. Die Aktivität des PsaE-freien PSI-Trimerkomplexes wurde in den angegebenen Puffern (20 mM) bestimmt. MgCl₂ und CaCl₂ wurden, wenn angegeben, in einer Endkonzentration von 10 mM hinzugegeben. Der PSI-Puffer enthielt 30 mM HEPES (pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die SH in diversen Puffersystemen ähnlich hohe NAD⁺-Reduktionsaktivitäten besitzt, unter anderem in dem standardmäßig für das PSI verwendeten Aktivitätspuffer. Die MV-abhängige H₂-Produktion des heterotetrameren SH-Komplexes war in K-PO₄-Puffer bei pH 7,0 maximal. Da bei Zusatz von MgCl₂ auch das PSI in diesem Puffer sehr gute Aktivitäten zeigte, sollte neben dem PSI-Puffer (HEPES-KOH (30 mM, pH 7,5) mit 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM) auch 20 mM K-PO₄-Puffer (pH 7,0) mit 10 mM MgCl₂ und 0,03 % (w/v) DDM für die *In-vitro*-Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe zum Einsatz kommen.

3.2.2.4 Analyse der SH-PSI-Hybridkomplexe hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur H₂-Produktion in Lösung

Aufbauend auf den zuvor als für die Einzelkomponenten als geeignet ermittelten Parametern sowie den bereits von Alexander Schwarze optimierten Parametern sollte hier nun erneut der Versuch unternommen werden, eine lichtabhängige H₂-Produktion der SH-PSI-Hybridkomplexe in Lösung zu zeigen.

Dazu wurden Cyt *c*₆ (25 nmol), PsaE-freier PSI-Trimerkomplex (10 μg Chl; 112 pmol PSI-Reaktionszentren) und SH^{PsaE} (150 pmol) in einem mit N₂ überschichteten 1 ml-Ansatz im Licht einer Halogenlampe mit 665 nm-Bandfilter (~200 μE s⁻¹ m⁻²) inkubiert (vgl. 2.7.3.1). Zwei verschiedene Puffersysteme mit 20 mM Natriumascorbat als Elektronendonator wurden

hierbei getestet – erstens: 30 mM HEPES-KOH (pH 7,5) mit 50 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 330 mM Mannitol und 0,03 % (w/v) DDM und zweitens: 20 mM K-PO_4 (pH 7,0) mit 10 mM MgCl_2 und 0,03 % (w/v) DDM. In den nach zweistündiger Inkubation aus den Gasphasen der 7,6 ml-großen Reaktionsgefäße entnommenen Proben konnte jedoch kein H_2 nachgewiesen werden. Entsprechende Kontrollen haben gezeigt, dass H_2 in Mengen ab 250 pmol im Reaktionsgefäß nachweisbar gewesen wären.

In Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. T. Happe und Prof. M. Rögner von der Universität Bochum wurde mit einem für die Kopplung von PSI mit [FeFe]-Hydrogenasen entwickelten Protokoll (vgl. 2.7.3.2) die lichtabhängige H_2 -Produktion der SH^{PsaE} -PSI Δ PsaE- und SH^{PsaD} -PSI Δ PsaD-Hybridkomplexe sowie der Kombination der SH^{PetF} mit Wildtyp-PSI untersucht. Wesentliche Unterschiede dieses Protokolls gegenüber vorangegangenen Ansätzen waren die Präparation des Ansatzes unter strikt anaeroben Bedingungen, die Konzentration der Reaktionspartner in einem kleineren Volumen von nur 200 μl sowie die Inkubation der Ansätze in einem mit weißen LEDs beleuchteten ($\sim 400 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$), auf 37 °C temperierten Wasserbad. Eine lichtabhängige H_2 -Entwicklung konnte jedoch auch in diesem Versuch nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte auch unter Verwendung des Cyt c_6 als Elektronenmediator keine H_2 -Produktion der SH-PSI-Hybridkomplexe in Lösung beobachtet werden. Deshalb wurde im Folgenden eine Charakterisierung mit elektrochemischen Verfahren angestrebt. Ein solches Verfahren, bei dem der Hydrogenase-PSI-Hybridkomplex auf einer Elektrode immobilisiert wird, hatte es ermöglicht, für die MBH^{PsaE} -PSI Δ PsaE-Hybride eine lichtabhängige H_2 -Produktion zu demonstrieren. Versuche in Anlehnung an die MBH-PSI-Hybrid-Experimente, bei der His-Tag-tragende PSI-Komplexe auf einer mit Ni^{2+} -NTA-Linkern funktionalisierten Goldelektrode immobilisiert werden, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Heberle an der Freien Universität Berlin durchgeführt (Kapitel 3.2.3.1). Ein alternativer Ansatz, bei dem die assemblierten SH-PSI-Hybride in einem Osmium-Polymer eingebettet auf eine Elektrode aufgebracht werden, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Rögner an der Universität Bochum getestet (Kapitel 3.2.3.2).

3.2.3 Elektrochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe

3.2.3.1 Untersuchungen an einer funktionalisierten Au-Elektrode in Kombination mit SEIRA-Spektroskopie

Eine umfassende Beschreibung zur Etablierung und Optimierung der hier beschriebenen Versuche findet sich in der Diplomarbeit von Moritz Senger (M. Senger, 2013), der die Experimente durchgeführt und ausgewertet hat.

In Analogie zu den an immobilisierten MBH^{PsaE} -PSI Δ PsaE-Hybridkomplexen durchgeführten Experimenten (Krassen *et al.*, 2009, A. Schwarze, 2010) sollte hier die Fähigkeit der SH^{PsaE} -PSI Δ PsaE-Komplexe zur lichtgetriebenen H_2 -Produktion mit Proteinfilm-Elektrochemie und gaschromatographischen Analyseverfahren untersucht werden. Dazu wurde der PsaE-freie His10-PSI-Komplex auf einer mit Ni^{2+} -Nitrilotriessigsäure(NTA)-Linkern funktionalisieren Goldelektrode immobilisiert. Durch Zugabe des komplementären SH^{PsaE} -Komplexes wurde der Hybridkomplex vervollständigt (siehe Abb. 20).

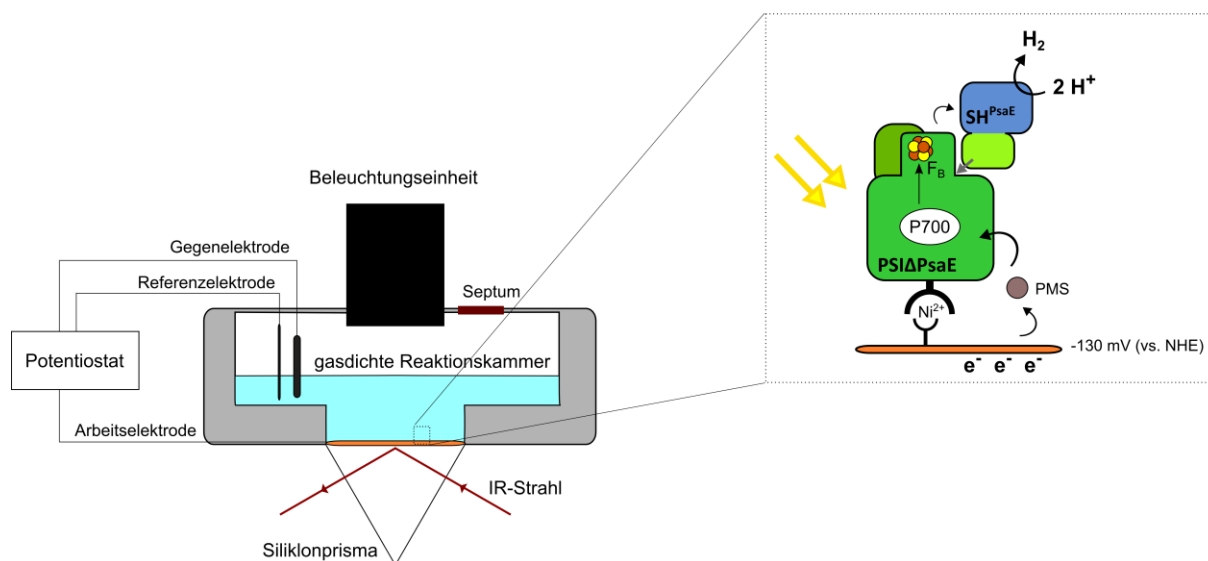


Abb. 20 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (in Anlehnung an Figure 12 aus M. Senger, 2013). Die PSI-Komplexe wurden über einen His10-Tag auf einer mit Ni^{2+} -NTA-Linkern funktionalisierten Goldelektrode immobilisiert. Die auf ein Silikonprisma aufgebrachte Elektrode diente als Arbeitselektrode für elektrochemische Messungen und ermöglicht oberflächenverstärkte IR-Absorptionsmessungen (SEIRAS). Elektronen hohen Potentials werden über den Elektronenmediator PMS (75 μM) von der Elektrode auf das PSI übertragen. Ob die im PSI durch die Lichtenergie auf ein höheres Energieniveau angehobenen Elektronen im Hybridkomplex weiter auf die SH übertragen werden, um dort eine Reduktion von Protonen zu ermöglichen, war die Fragestellung dieser Untersuchung. Für gaschromatographische Analysen wurden Proben über ein Septum aus der gasdichten Reaktionskammer entnommen.

Die Immobilisierung des PSI Δ PsaE-Komplexes sowie die Assemblierung des Hybridkomplexes wurden mittels *Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy* (SEIRAS) verfolgt. Die Absorption im Bereich der für die Peptidbindung charakteristischen C=O- und C-N-Streckschwingungen (Amid I und Amid II) nimmt durch Bindung von Protein an die Oberfläche der Elektrode zu. Auch die Bindung des SH^{PsaE}-Komplexes an die immobilisierten PSI Δ PsaE-Komplexe resultierte in einer Zunahme der Absorption bei 1663 cm⁻¹ (Amid I) und 1551 cm⁻¹ (Amid II) im Vergleich zum Spektrum des PSI Δ PsaE-Monolayers (vgl. Abb. 21).

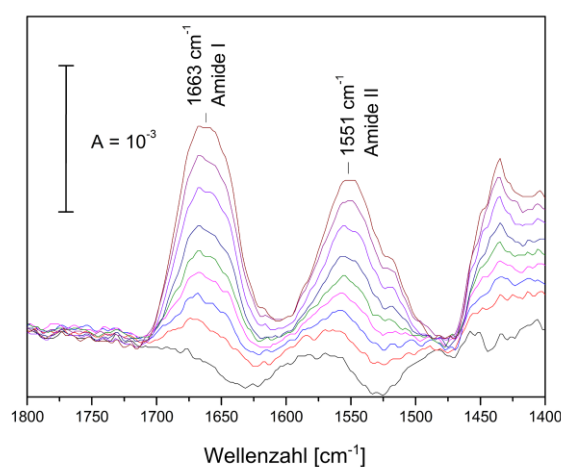


Abb. 21 SEIRA-Spektren der SH^{PsaE}-Bindung an die mit PsaE-freiem PSI funktionalisierte Elektrode (aus M. Senger, 2013, modifiziert). Dargestellt sind die Differenzspektren zum Spektrum der mit PSI Δ PsaE funktionalisierten Elektrode zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von SH^{PsaE} (0,75 µM). Die Banden der für die Peptidbindung charakteristischen C=O- (Amid I) und C-N- (Amid II) Streckschwingungen sind gekennzeichnet.

Zur funktionellen Charakterisierung des immobilisierten Hybridkomplexes wurden die Photoströme bei Beleuchtung mit Rotlicht und einem angelegten Potential von -130 mV (vs. NHE) in Gegenwart des Elektronenmediators Phenazinmethosulfat (PMS) für verschieden modifizierte Elektroden bestimmt (Tab. 7). Während die mit PsaE-freiem PSI-Komplex funktionalisierten Elektroden mit 230 nA einen deutlich höheren Photostrom zeigten als die mit wildtypischen PSI-Komplex funktionalisierten Elektroden (60 nA), war für die mit dem SH^{PsaE}-PSI Δ PsaE-Hybridkomplex modifizierten Elektroden ein Rückgang des Photostroms auf das Niveau der PSI-WT-Elektroden zu beobachten (vgl. Tab. 7). Eine Abschirmung des im PSI Δ PsaE-Komplex freiliegenden F_B-Clusters gegenüber dem Elektronenmediator PMS im rekonstituierten SH-PSI-Hybridkomplex ist eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung.

Tab. 7 Photoströme der mit SH^{PsaE}-PSIΔPsaE-Hybridkomplexen modifizierten Elektroden im Vergleich zu diversen Kontrollen (aus M. Senger, 2013, modifiziert). Die Ströme wurden bei einem Potential von -130 mV relativ zur NHE in 100 mM HEPES (pH 7,5) mit 10 mM CaCl₂ (1 mM für SH^{PsaE}-PSIΔPsaE), 10 mM MgCl₂ (1 mM für SH^{PsaE}-PSIΔPsaE) und 75 μM PMS unter Beleuchtung mit Rotlicht gemessen.

	Photostrom [nA]
PSI-WT	60
PSIΔPsaE	230
SH ^{PsaE} -PSIΔPsaE	60
mit Ni ²⁺ -NTA-Linkern funktionalisierte Goldelektrode	-40
blanke Goldelektrode	0

Weiterhin wurde untersucht, ob sich der als Endprodukt der lichtabhängigen Redoxkaskade erwartete Wasserstoff nachweisen lässt. Dazu wurden Proben aus der Gasphase der Reaktionsansätze im Gaschromatographen analysiert. Hierbei konnten für den Ansatz mit dem SH^{PsaE}-PSIΔPsaE-Hybridkomplex zwar Spuren von H₂ detektiert werden (Tab. 8), die ermittelte lichtabhängige H₂-Produktionsrate lag jedoch unter denen der als Kontrollen verwendeten Elektroden (vgl. Tab. 8). Dies könnte auf einen Verbrauch des unspezifisch produzierten Wasserstoffs durch die Hydrogenase hindeuten.

Tab. 8 H₂-Produktionsraten der modifizierten Elektroden unter Beleuchtung (aus M. Senger, 2013, modifiziert). Mittlere H₂-Produktionsraten nach 5-stündiger Beleuchtung mit einer Halogenkaltlichtlampe KL1500 bezogen auf die Fläche der Elektrode. Die Inkubation erfolgte in 100 mM HEPES (pH 7,5) mit 10 mM CaCl₂ (1 mM für SH^{PsaE}-PSIΔPsaE), 10 mM MgCl₂ (1 mM für SH^{PsaE}-PSIΔPsaE) und 75 μM PMS bei -130 mV vs. NHE.

	H₂-Produktionsaktivität [pmol H₂ s⁻¹ cm⁻²]
PSI-WT	7,97 ± 1,97
PSIΔPsaE	10,97 ± 2,71
SH ^{PsaE} -PSIΔPsaE	4,36 ± 0,59
blanke Goldelektrode	8,39 ± 2,07

Zur Überprüfung der Stabilität des SH-Komplexes wurde die Methylviologen-abhängige H₂-Produktionsaktivität des Überstands aus der Reaktionskammer bestimmt. Diese entsprach mit 10,4 ± 3,5 μmol MV min⁻¹ mg⁻¹ Protein ungefähr der spezifischen Aktivität des isolierten SH^{PsaE}-Komplexes von 6,6 ± 1,3 μmol MV min⁻¹ mg⁻¹ Protein.

Zusammenfassend konnte eine Assemblierung des SH^{PsaE} -Komplexes mit dem PsaE-freien PSI-Derivat bestätigt werden. Die Ergebnisse der elektrochemischen Charakterisierung sowie der gaschromatographischen Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass keine effiziente Übertragung von Elektronen zwischen PSI und Hydrogenase stattfindet.

3.2.3.2 Untersuchungen von SH-PSI-Hybridkomplexen an mit Osmium-Polymeren beschichteten Elektroden

Die hier beschriebenen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Tim Kothe aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. Rögner an der Universität Bochum durchgeführt.

In einem für die Halbzelle einer Biobatterie (Badura *et al.*, 2011b) entwickelten Versuchsaufbau werden PSI-Komplexe in einem Osmium-Polymer immobilisiert und durch dieses leitend mit einer Gold- oder Glaskohlenstoffelektrode verbunden (Abb. 22A). In Gegenwart eines geeigneten Elektronenakzeptors kann so ein lichtabhängiger Strom gemessen werden (Badura *et al.*, 2011a). In dem bisher etablierten Versuchsaufbau wurden MV als Elektronenmediator und O_2 als terminaler Elektronenakzeptor eingesetzt (Abb. 22A). Langfristig soll dieses System jedoch durch an das PSI gekoppelte Hydrogenasen ersetzt werden. Diese könnten die Elektronen auf H^+ -Ionen übertragen und so eine lichtabhängige Wasserstoffproduktion ermöglichen (Abb. 22B). Hier sollte eine solche Kopplung unter Verwendung der chimären SH-Varianten getestet werden. Gleichzeitig sollte somit die Funktionalität der SH-PSI-Hybridkomplexe demonstriert werden.

Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass auch PSI-Derivate ohne His-Tag, wie das $\text{PSI}\Delta\text{PsaD}$, immobilisiert werden können. Insgesamt wurden die folgenden vier Kombinationen von SH- und PSI-Derivaten untersucht: (1) $\text{PSI}\Delta\text{PsaD} + \text{SH}^{\text{PsaD}}$, (2) $\text{PSI}\Delta\text{PsaE} + \text{SH}^{\text{PsaE}}$, (3) $\text{PSI}\Delta\text{PsaE} + \text{SH}^{\text{WT}}$ und (4) $\text{PSI-WT} + \text{SH}^{\text{PetF}}$. Für alle Ansätze wurden die lichtabhängigen Ströme in An- und Abwesenheit von O_2 und/oder MV bestimmt und mit denen der solitären PSI-Derivate verglichen.

Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der Untersuchung am $\text{PSI}\Delta\text{PsaD-SH}^{\text{PsaD}}$ -Komplex dargestellt (Abb. 23). Während für Elektroden mit solitären PSI-Derivaten in Abwesenheit von O_2 kein signifikanter Strom gemessen wurde, ermöglichte die Kombination der $\text{PSI}\Delta\text{PsaD}$ -Komplexe mit den entsprechenden SH^{PsaD} -Derivaten einen lichtabhängigen Strom von $0,5 \mu\text{A cm}^{-2}$. Interessanterweise wurde dieser Strom durch MV inhibiert. In den Kontrollen mit O_2 als terminalem Elektronenakzeptor wurde für beide Systeme ein

lichtabhängiger Strom von $1 \mu\text{A cm}^{-2}$ bestimmt. Ungewöhnlicherweise wurde dabei kein positiver Einfluss des Elektronenmediators MV beobachtet.

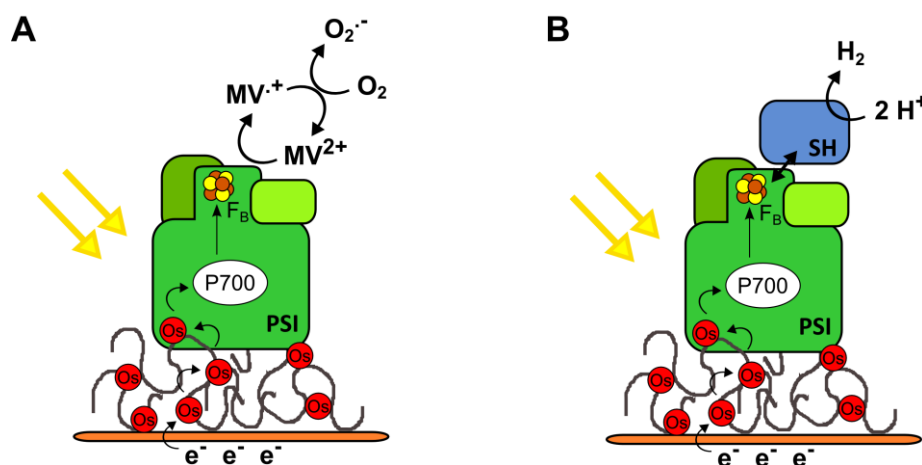


Abb. 22 Schematische Darstellung der Kopplung von PSI-Komplexen über ein Osmium-Polymer an Elektroden. Die in einem Osmium-Polymer eingebetteten PSI-Komplexe sind durch dieses leitend mit einer Elektrode verbunden. Durch Lichtenergie werden Elektronen im Reaktionszentrum des PSI (P700) auf ein höheres Energieniveau angehoben und so der F_B -Clusters des PSI reduziert. (A) Im bisher etablierten System werden die Elektronen vom F_B -Cluster über Methylviologen (MV) auf O_2 übertragen und so ein messbarer Photostrom ermöglicht. (B) In dieser Arbeit sollten die energiereichen Elektronen vom F_B -Cluster auf die SH übertragen werden.

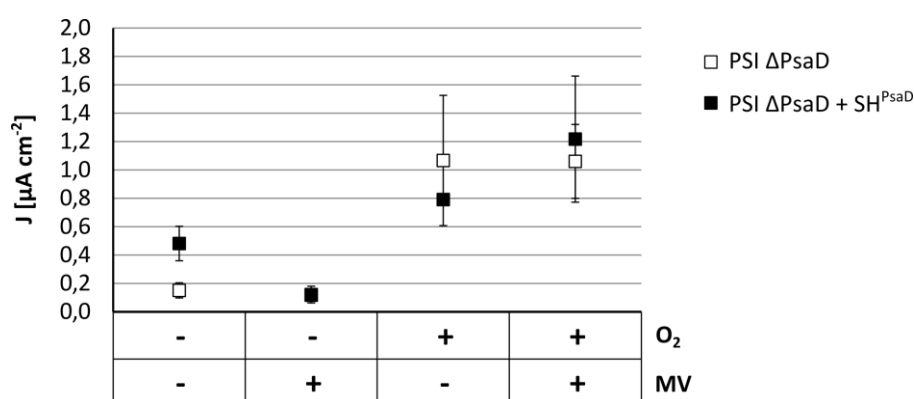


Abb. 23 Elektrochemische Charakterisierung der SH^{PsaD} -PSI Δ PsaD-Hybridkomplexe. PSI Δ PsaD-Komplexe ($2,5 \mu\text{g PSI/Elektrode}$) bzw. SH^{PsaD} -PSI Δ PsaD-Hybridkomplexe ($2,5 \mu\text{g PSI}$ und $7,5 \mu\text{g SH/Elektrode}$) wurden in einem mit Osmium funktionalisierten Polymer auf Goldelektroden ($3,14 \text{ mm}^2$) immobilisiert. Die lichtabhängigen Stromdichten wurden in Abwesenheit und Anwesenheit von O_2 (Formiergas: 95 % (v/v) N_2 / 5 % (v/v) H_2 bzw. Luft: 21 % (v/v) O_2) und Methylviologen (MV, 3 mM) bei einem Potential von 0 mV vs. Ag/AgCl bestimmt. Die Äquilibration der modifizierten Elektrode wurde bei pH 9,0 durchgeführt, die Aktivitätsmessungen bei pH 4,0. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Varianz von je zwei präparierten Elektroden.

Die Ergebnisse weiterer Messungen, unter anderen auch von Ansätzen, bei denen Äquilibrierung und Aktivitätsmessung bei pH 7,0 durchgeführten wurden, sind im Anhang dieser Arbeit zusammengefasst (Abb. S3 und Abb. S4). Nicht in allen Fällen konnte unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit der Hydrogenase ein lichtabhängiger Strom gemessen werden. In einigen Experimenten war der für das solitäre PSI gemessene Photostrom (in Anwesenheit von O₂) deutlich höher als der des entsprechenden SH-PSI-Hybridkomplexes. Insgesamt waren die gemessenen Stromdichten, insbesondere in Anwesenheit von O₂ und MV, jedoch sehr gering. Für immobilisierte PSI-Trimere aus *Thermosynechococcus elongatus* wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen Stromdichten von bis zu 120 µA cm⁻² in Luft gemessen (Tim Kothe, AG Rögner - persönliche Kommunikation). Für weitere Experimente scheint also eine Optimierung der Bedingungen für die Derivate des *Synechocystis* PSI-Komplex notwendig zu sein. Außerdem wäre es von Vorteil, ein geschlossenes Versuchssystem zu etablieren, welches keinen Gasaustausch mit der Umgebung zulässt. So könnte als Komplementation zu den Messung der Photoströme der gegebenenfalls produzierte Wasserstoff eindeutig nachwiesen werden.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Aminosäureumgebung des Eisenschwefelclusters in HoxY auf die Sauerstofftoleranz der SH aus *R. eutropha* H16

Eine alternative Strategie zur heterologen Expression der O₂-toleranten SH aus *R. eutropha* in Cyanobakterien (siehe 3.1) ist die Umwandlung endogener cyanobakterieller [NiFe]-Hydrogenasen in O₂-tolerante Enzyme. Hierfür ist die Kenntnis der der O₂-Toleranz zugrunde liegenden Mechanismen eine grundlegende Voraussetzung. Ziel dieser Studie war es deshalb, die Aufklärung der O₂-Toleranz der SH voranzutreiben. Jüngere Arbeiten an O₂-toleranten Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen haben gezeigt, dass bei diesem Typ von Hydrogenasen ein ungewöhnlicher FeS-Cluster in der kleinen Hydrogenaseuntereinheit eine Schlüsselfunktion für die O₂-Toleranz besitzt. Dieser FeS-Cluster ist in der Lage, Elektronen für eine schnelle reduktive Reaktivierung des aktiven [NiFe]-Zentrums zu speichern (Fritsch *et al.*, 2013). Da die Arbeiten von Lauterbach und Lenz, 2013, darauf hinweisen, dass auch im Fall der SH das aktive [NiFe]-Zentrum durch reduktive Prozesse vor Schädigung durch O₂ geschützt wird, sollte hier die Rolle des für die HoxY-Untereinheit der SH postulierten FeS-Cluster als Elektronenspeicher näher untersucht werden. Um mögliche Besonderheiten dieses FeS-Clusters aufzudecken, wurden ein Aminosäure-Motivaustausch sowie Einzelaustausche in HoxY vorgenommen und die daraus resultierenden Varianten des SH-Komplexes hinsichtlich ihrer biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften untersucht.

3.3.1 Vorbereitende Arbeiten für die Mutantenstudie an der SH

3.3.1.1 Etablierung des *strep-hoxF*-Allels auf dem Megaplasmid eines nur die SH-produzierenden *R. eutropha*-Derivats

Da die im Folgenden etablierten SH-Varianten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* charakterisiert werden sollten, wurde zunächst ein *R. eutropha*-Stamm konstruiert, der eine *Strep*-Tag II-tragende Version der SH im natürlichen Kontext des Megaplasmid pHG1 codiert. Durch Vermeidung eines Überexpressionssystems sollten so möglichst "naturnahe" physiologische Studien ermöglicht werden und gleichzeitig die Möglichkeit geschaffen werden, die SH-Komplexe schnell und effizient zu reinigen. Hierzu wurde ein im Überexpressionssystem bereits etabliertes *strep-hoxF*-Allel (Lauterbach und Lenz, 2013) durch doppelt homologe Rekombination in den Stamm HF869 eingebracht (siehe auch 2.4.3). Der Ausgangstamm sowie der neu isolierte Stamm, HF1009, produzieren aufgrund von Deletion in *hoxG*, *hoxC*

und *hofG* ausschließlich die lösliche Hydrogenase, womit eine weitere Voraussetzung für aussagekräftige *In-vivo*-Studien erfüllt wurde.

Wie eine Testreinigung zeigte, kann der SH-Komplex mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie aus dem Stamm HF1009 aufgearbeitet werden (Abb. 24A). Durchschnittlich wurden dabei Proteinausbeuten von 1-2 mg Proteinkomplex pro g Zellen (Nassgewicht) erzielt. Das SH-basierte chemolithoautotrophe Wachstum des neuen Stamms wurde durch die Modifikation der HoxF-Untereinheit nicht beeinflusst (Abb. 24B).

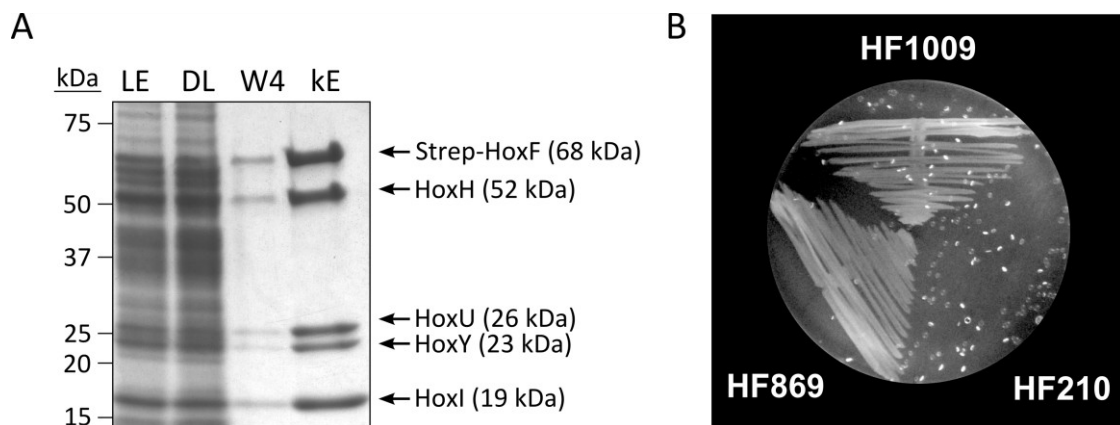


Abb. 24 Initiale Charakterisierung des *Strep*-SH^{WT}-produzierenden *R. eutropha*-Stamms HF1009. (A) Reinigung des SH-Komplexes mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie, je 10 µg Protein des löslichen Extrakts (LE) und des Durchlaufs (DL), 5 µl der letzten Waschfraktion und 5 µg Protein der konzentrierten Eluatsfraktion wurden im SDS-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. (B) SH-basiertes lithoautotrophes Wachstum des HF1009-Stamms im Vergleich zum Ausgangsstamm HF869 (ohne *Strep*-Tag an HoxF) und zum SH⁻-Stamm HF210 (unter einer Atmosphäre aus 3 % H₂/10 % CO₂/ 20 % O₂/ 67 % N₂)

Der hier etablierte *R. eutropha*-Stamm HF1009 diene als Grundlage für alle im Folgenden beschriebenen Mutantenstämme. Er wurde außerdem als Referenzstamm für wildtypische SH eingesetzt.

3.3.1.2 Biochemische Eigenschaften der nativen SH aus *R. eutropha*

Die SH aus *R. eutropha* wird seit über 30 Jahren untersucht. Diverse biochemische Charakterisierungen wurden im Laufe dieser Zeit veröffentlicht, z. B. in Schneider und Schlegel, 1976, Schneider und Schlegel, 1978, Burgdorf *et al.*, 2005b und Lauterbach und Lenz, 2013. Dabei variierten die Bedingungen, unter denen Aktivitätsbestimmungen durchgeführt wurden, beispielsweise die Verwendung von Zusätzen wie Flavinmononukleotid (FMN). Um für die hier angestrebte Mutantenstudie geeignete Versuchsbedingungen zu

definieren, wurde die Aktivität des heterohexameren, wildtypischen SH-Komplexes und dessen Stabilität unter Einsatz verschiedener Zusätze getestet (siehe Abb. 25).

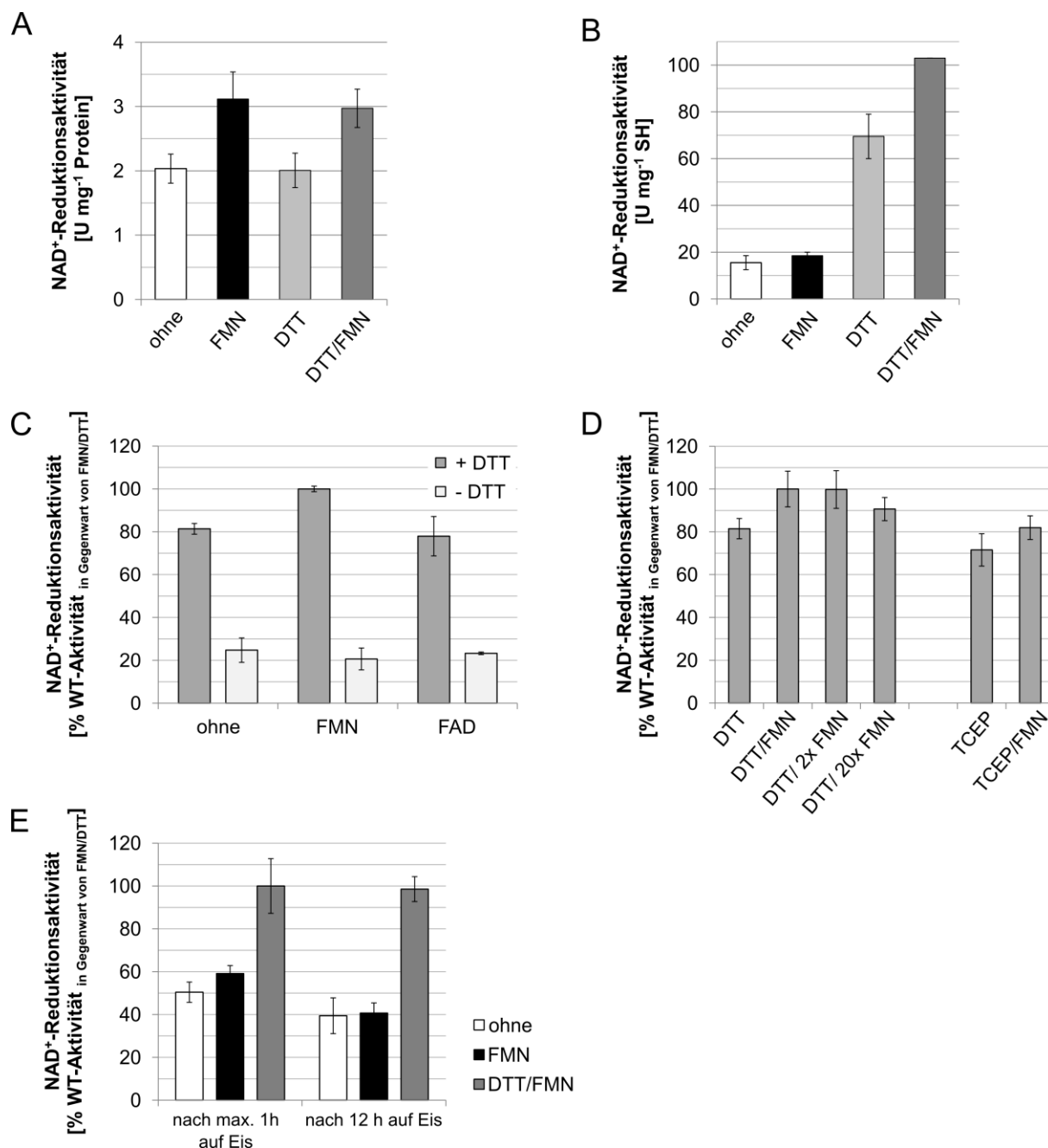


Abb. 25 Charakteristika der nativen SH aus *R. eutropha* H16. NAD⁺-Reduktionsaktivitäten der durch Lyse mit CTAB präparierten Rohextrakte (A) bzw. der gereinigten SH-Komplexe (B-E) wurden photometrisch bestimmt. Ein Unit (1 U) entspricht der Produktion von 1 μ mol NADH min⁻¹. Die Aktivitäten von C-E wurden auf die Aktivität der frischen Probe in Gegenwart von 1 mM DTT/ 1 μ M FMN bezogen. Die Zusätze wurden in den folgenden finalen Konzentrationen hinzugegeben: 1 μ M Flavinmononukleotid (FMN), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 μ M Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), 1 mM Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP).

Im durch Zellyse mittels Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) präparierten Rohextrakt hatte die Verwendung des milden Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) keinen Einfluss auf die Höhe und Stabilität der SH-spezifischen NAD^+ -Reduktionsaktivität (Abb. 25A). Deutlich war jedoch die positive Wirkung von FMN auf die Höhe der Aktivität zu erkennen (Abb. 25A). Für den isolierten SH-Komplex konnte ein positiver Effekt von DTT auf die Stabilität und Höhe der NAD^+ -Reduktionsaktivität gezeigt werden, welcher durch die Zugabe von FMN noch gesteigert wurde (Abb. 25B). Der Einsatz von FMN allein zeigt jedoch kaum einen Effekt auf die Aktivität des gereinigten SH-Komplexes (Abb. 25B+C). Die Zugabe von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) zum Reaktionsansatz hatte auch unter reduzierenden Bedingungen keine positive Wirkung auf die SH-Aktivität (Abb. 25C). Die Erhöhung der FMN-Konzentration auf 2 bzw. 20 μM zeigte keinen signifikanten Effekt auf die NAD^+ -Reduktionsaktivität (Abb. 25D). Entgegen den Beobachtungen aus anderen Arbeiten konnte hier bei Substitution von DTT durch das Reduktionsmittel Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP) zwar eine verbesserte Stabilität der SH-Aktivität, jedoch keine auf das Niveau der mit DTT-versetzten Ansätze erhöhte Aktivität beobachtet werden (Abb. 25D, Lauterbach und Lenz, 2013). Weiterhin zeigte sich, dass die NAD^+ -Reduktionsaktivität der SH bei längerer Lagerung auf Eis abnimmt (Abb. 25E). Dieser „Alterungsprozess“ der Enzymprobe konnte durch Zugabe von DTT und FMN zum Reaktionsansatz revertiert werden (vgl. Abb. 25E). Die Zugabe von FMN allein reichte allerdings nicht aus, um die ursprüngliche Aktivität wieder herzustellen (Abb. 25E). Traditionell wird die Entstehung von NADH bei Aktivitätsmessungen der SH bei einer Wellenlänge von 365 nm verfolgt ($\epsilon_{\text{NADH},365} = 3,43 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ NADH cm}^{-1}$). Wie in einer vergleichenden Messreihe gezeigt werden konnte, unterscheiden sich die hierbei bestimmten Aktivitäten auch bei Zugabe von farbigen Zusätzen, wie beispielsweise FMN, nicht von den beim Absorptionsmaximum von NADH (340 nm, $\epsilon_{\text{NADH},340} = 6,13 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ NADH cm}^{-1}$) ermittelten Aktivitäten (Abb. S2). Die H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktion wurde deshalb weiterhin bei 365 nm verfolgt.

Um stabile und somit vergleichbare Aktivitäten zu bestimmen, wurden im Folgenden für NAD^+ -Reduktionsmessungen an den isolierten SH-Proteinen 1 μM FMN und 1 mM DTT hinzugegeben, sofern nicht anders vermerkt. Für Aktivitätsmessungen in Extrakten wurden keine Zusätze verwendet. Auch bei dem unter reduzierenden Bedingungen durchgeführten H_2 -Produktionsansatz wurde auf weitere Zusätze verzichtet, da die Zugabe von FMN bzw. DTT kaum einen Effekt auf die MV-abhängige H_2 -Produktionsaktivität der nativen SH bewirkt hatte (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.3 Verlust der HoxY-Untereinheit durch Austausch eines kompletten Motivs

Die kleine Hydrogenaseuntereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen besitzt Ähnlichkeit zu der als Nqo6 (*Thermus thermophilus*) bzw. NuoB (*E. coli*) bezeichneten Untereinheit des Komplex I. Beide Proteinfamilien weisen eine konservierte, als *HydA/Nqo6-like* bezeichnete Proteinfaltung auf (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.f.ch.A.html>) durch die in den meisten Fällen ein [4Fe4S]-Cluster koordiniert wird. Trotz dieser hohen Ähnlichkeit der Proteinfamilien gibt es Unterschiede im Bindemotiv für den FeS-Cluster. Während der (proximale) [4Fe4S]-Cluster in Hydrogenasen in der Regel durch ein CxxC-(x)_n-C-(x)_n-C-Motiv koordiniert wird, findet man in den Komplex I-Untereinheiten ein CC-(x)_n-C-(x)_n-C-Motiv (vgl. Abb. 26). Um zu untersuchen, ob eine Umwandlung der postulierten Bindestelle in HoxY in eine Komplex I-spezifische Konfiguration möglich ist und welche Auswirkungen dies auf die Funktionalität des SH-Komplexes hat, sollte hier das Peptid C39-L49 in HoxY gegen den entsprechenden Bereich des Nqo6-Proteins aus *T. thermophilus* ausgetauscht werden.

Der Motivaustausch wurde basierend auf dem bei Lauterbach *et al.*, 2011b veröffentlichten Sequenzvergleich geplant (vgl. Abb. 26A). Spätere Sequenzvergleiche mit der aktuellen Version des Programmes *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) sowie ein Strukturvergleich der kleinen Hydrogenaseuntereinheit aus *Desulfovibrio vulgaris* mit der Nqo6-Untereinheit aus *T. thermophilus* zeigten jedoch, dass der Cysteinrest C44 in HoxY dem C46 aus Nqo6 entspricht (vgl. Abb. 26B+C), wie auch in Goris *et al.*, 2011 beschrieben. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass durch den hier konstruierten Mutantenstamm kein funktionelles HoxY produziert wurde (Abb. 27A). Dieser HoxY⁻-Stamm ist jedoch aus drei Gründen interessant und wird deshalb hier beschrieben: Erstens werden trotz des Fehlens der HoxY-Untereinheit die verbleibenden Strukturproteine der SH produziert, wenn auch im verminderten Maßstab. Zweitens lassen sich diese auch in Abwesenheit von HoxY als Komplex über den *Strep*-Tag II an HoxF reinigen. Und drittens zeigt das SDS-Gel dieses modifizierten SH-Komplexes eine Proteinbande bei 25 kDa, die durch *Peptid Fingerprint*-Analyse als HoxU-Protein identifiziert werden konnte (Abb. 27B). Diese verkürzte Version von HoxU war bereits in früheren Arbeiten am isolierten NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Modul HoxFU beobachtet worden (Lauterbach *et al.*, 2011a) und weist darauf hin, dass das HoxY-Protein eine stabilisierende Wirkung auf HoxU hat.

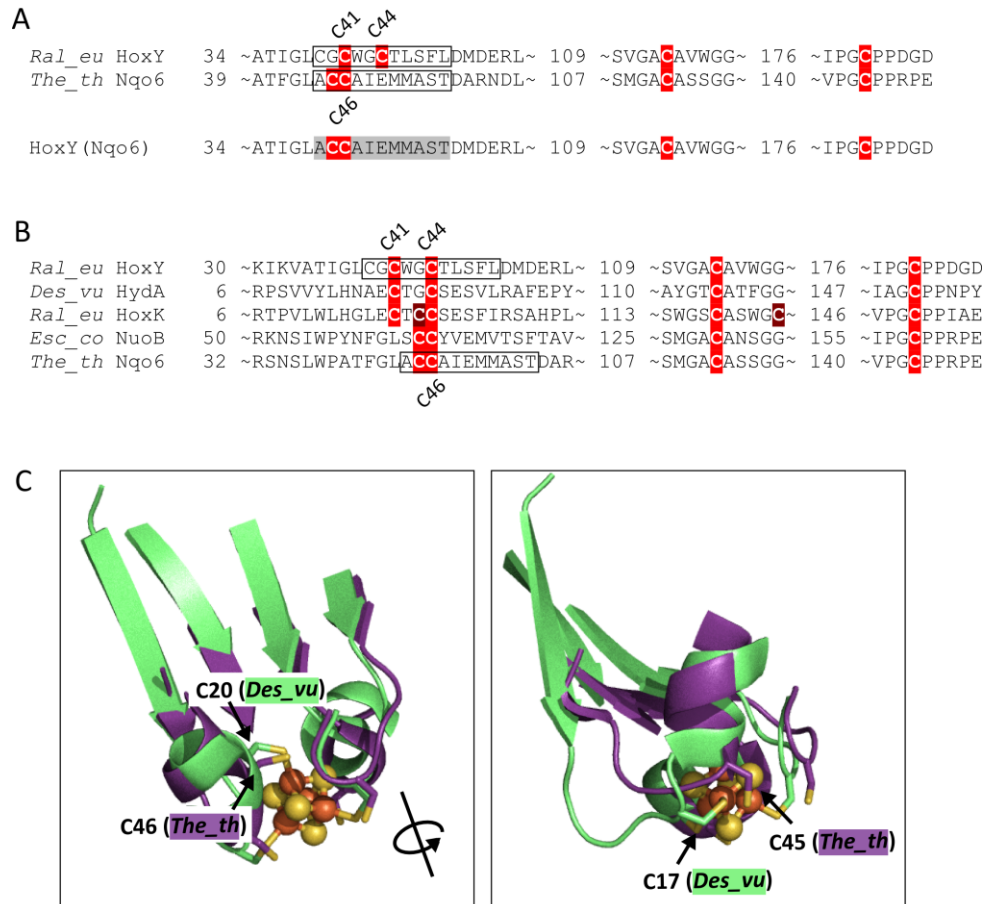


Abb. 26 Vergleich der FeS-Cluster-Bindemotive aus der kleinen Hydrogenaseuntereinheit und der Nqo6-Untereinheit von Komplex I. (A) Initialer Sequenzvergleich von HoxY aus *R. eutropha* und Nqo6 aus *T. thermophilus* (Lauterbach *et al.*, 2011b), der für die Planung des den Motivaustausch enthaltenen HoxY-Derivats (HoxY^{Nqo6}) verwendet wurde. (B) Korrigierter Sequenzvergleich, welcher zusätzlich die Sequenzen von HydA aus *Desulfovibrio vulgaris*, von HoxK aus *R. eutropha* sowie von der Komplex I-Untereinheit NuoB aus *E. coli* enthält. (C) Strukturvergleich der konservierten Proteinfaltung in HydA aus *D. vulgaris* (pdb:1WUJ) und Nqo6 aus *T. thermophilus* (pdb:3IAM) mit [4Fe4S]-Cluster aus der *D. vulgaris*-Struktur. Die Cysteinreste C20 und C17 im *D. vulgaris*-Protein entsprechen den Cysteinresten C44 bzw. C41 in HoxY.

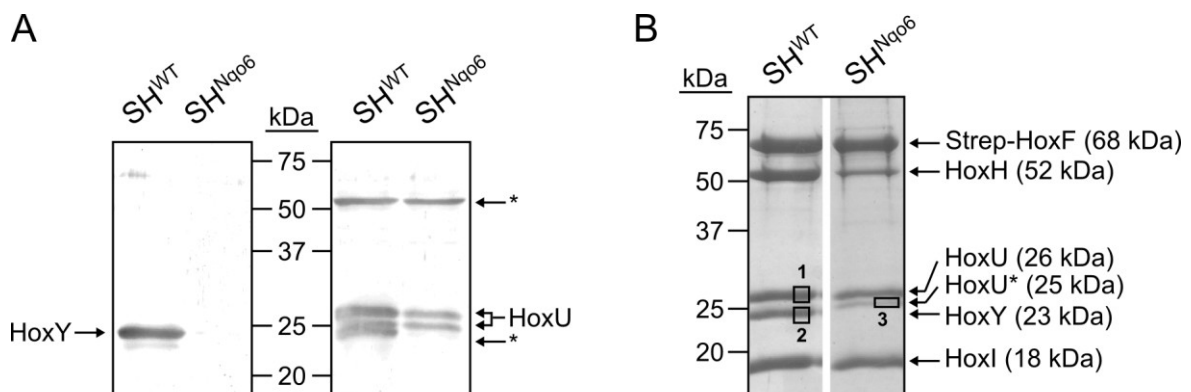


Abb. 27 Charakterisierung des SH^{Nqo6}-Mutantenstamms. - Legende auf der nächsten Seite

Legende Abb. 27 (A) Immunologischer Nachweis von HoxY (links) und HoxU (rechts) in den löslichen Extrakten des SH^{WT}- und des SH^{Nqo6}-Stamms. Durch den polyklonalen HoxU-Antikörper werden weitere Proteine (*) detektiert, bei denen es sich um HoxH und HoxY handeln könnte. (B) Der über den *Strep*-Tag II an HoxF aus dem SH^{Nqo6}-Stamm gereinigte Proteinkomplex (~0,1 mg Protein aus 1 g Zellen) enthält neben HoxF und HoxI auch substöchiometrische Mengen von HoxH sowie zwei Formen der HoxU-Untereinheit, wie das mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbte SDS-Gel zeigt. Durch *Peptid Fingerprint*-Analyse der Proteinbanden 1-3 konnte die mit 3 markierte Proteinbande eindeutig als HoxU-Derivat identifiziert werden.

Die für den hier beschriebenen HoxY⁻-Stamm beobachtete HoxU-Doppelbande wurde im Folgenden als Indikator für eine Destabilisierung des HoxY-Proteins verwendet. Aufgrund anderer Prioritäten wurde von der Konstruktion eines Stamms mit einem auf dem korrekten Sequenzvergleich basierenden Motivaustausch abgesehen.

3.3.2 Charakterisierung von SH-Derivaten mit Austausch einzelner Aminosäuren in HoxY

3.3.2.1 Auswahl interessanter Aminosäureaustausche basierend auf einem multiplen Sequenzvergleich

Um der Frage nachzugehen, ob ein modifizierter FeS-Cluster in der HoxY-Untereinheit zur O₂-Toleranz NAD⁺-abhängiger Hydrogenasen des *R. eutropha*-Typs beiträgt, sollten wesentliche Unterschiede zwischen den kleinen Hydrogenaseuntereinheiten der O₂-toleranten und O₂-sensitiven Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen auf Sequenzebene identifiziert werden. Hierzu wurde ein multipler Sequenzvergleich verschiedener HoxY-Untereinheiten des aeroben und des cyanobakteriellen Typs erstellt (Abb. 28). Soweit eine hinreichende biochemische Charakterisierung vorliegt, sind die Hydrogenasen des aeroben Typs O₂-tolerant und die des cyanobakteriellen Typs O₂-sensitiv (Schneider und Schlegel, 1981, Lauterbach und Lenz, 2013, Wilde und Schlegel, 1982, McIntosh *et al.*, 2011). Durch den zusätzlichen Vergleich der HoxY-Sequenzen mit homologen Proteinen bekannter 3D-Struktur konnte ein Topologie-Modell der HoxY-Untereinheit erstellt werden, welches die voraussichtliche Lage der interessant erscheinenden Aminosäuren zeigt (Abb. 29).

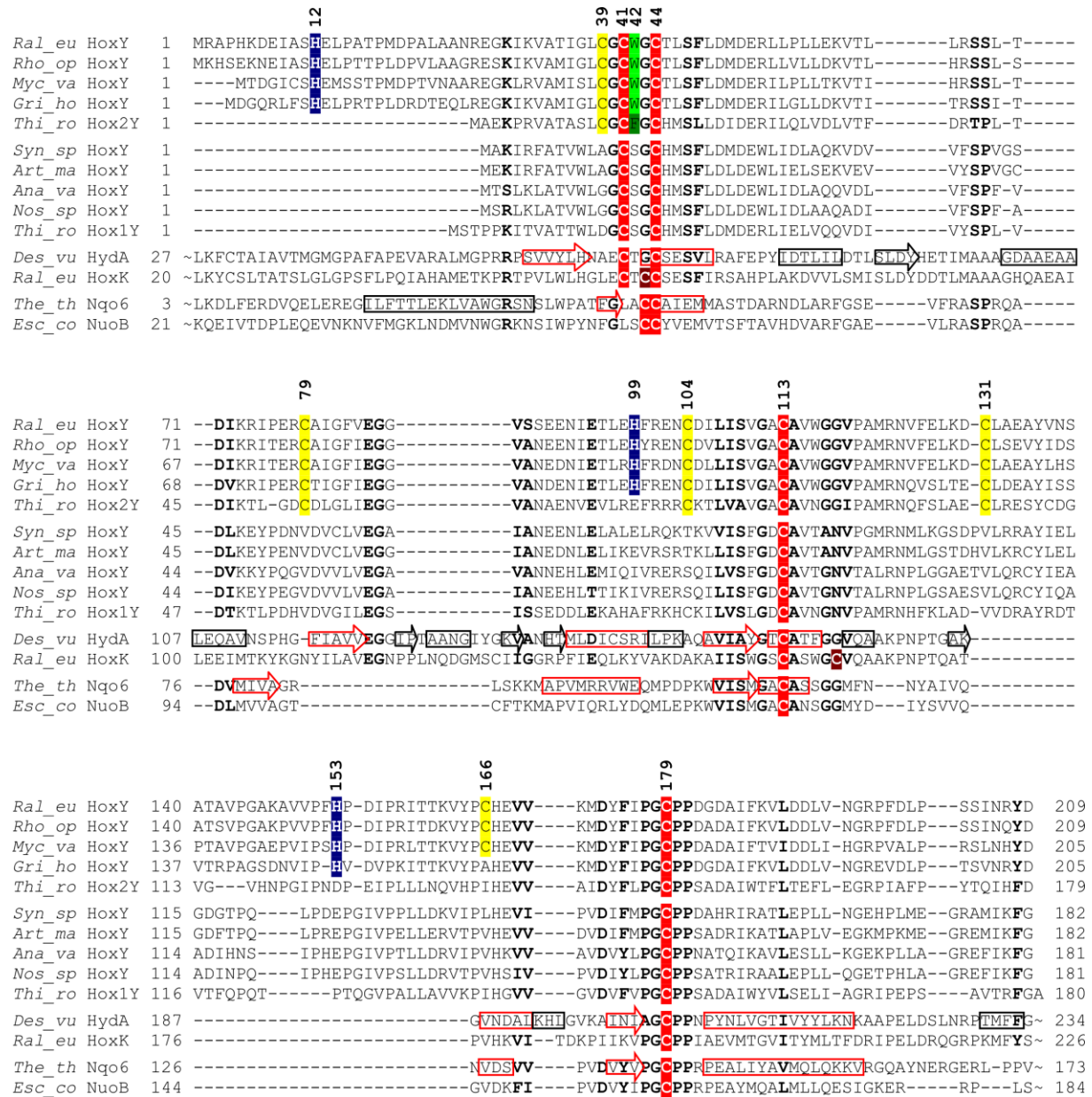


Abb. 28 Multipler Sequenzvergleich von HoxY-Proteinen des aeroben und des cyanobakteriellen Typs sowie homologer Untereinheiten aus Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen und Komplex I. HoxY-Proteine des aeroben Typs: Ral_eu HoxY - *Ralstonia eutropha* H16 (gb: AAP85843.1); Rho_op HoxY - *Rhodococcus opacus* MR11 (gb: AAB57891.1); Myc_va HoxY - *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (gb: ABM14891.1); Gri_ho HoxY - *Grimontia hollisiae* CIP 101886 (gb: EEY70874.1); Thi_ro Hox2Y - *Thiocapsa roseopersicina* (gb: ADK12980.1); **HoxY-Proteine des cyanobakteriellen Typs:** Syn_sp HoxY: *Synechocystis* sp. PCC 6803 (dbj: BAA18094.1); Art_ma HoxY: *Arthrospira maxima* CS-328 (gb: EDZ94739.1); Ana_va HoxY: *Anabaena variabilis* (dbj: BAB39386.1); Nos_sp HoxY: *Nostoc* sp. PCC 7120 (dbj: BAB72721.1); Thi_ro Hox1Y: *Thiocapsa roseopersicina* (gb: AAP50522.1); **Kleine Hydrogenaseuntereinheiten von Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen:** Des_vu HydA - *Desulfovibrio vulgaris* strain Miyazaki F (sp: P21853); Ral_eu HoxK - *Ralstonia eutropha* H16 (sp: P31892); **Untereinheiten aus Komplex I:** The_th Nqo6 - *Thermus thermophilus* (gb: AAA97939.1); Esc_co Nuob - *Escherichia coli* strain ATCC 9637 (tr: E0IY29). – Fortsetzung der Legende auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Legende Abb. 28

Hochkonservierte Cysteinreste (C) koordinieren ein [4Fe4S]-Cluster in HydA aus *D. vulgaris* und Nqo6 aus *T. thermophilus*. Für O₂-tolerante Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenasen charakteristische Cysteinreste (C) sind in die Koordination eines ungewöhnlichen [4Fe3S]-Clusters involviert. Einzelaminosäureaustausche in den für den aeroben Typ spezifischen Histidin-, Cystein- und Tryptophanresten (H, C, W) wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Positionen im HoxY-Protein von *R. eutropha* sind über den hervorgehoben Aminosäuren angegeben. Für HydA aus *D. vulgaris* und Nqo6 aus *T. thermophilus* wurden die aus den Kristallstrukturen bekannten Sekundärstrukturelemente durch Rechtecke (Helices) bzw. Pfeile (β-Stränge) gekennzeichnet. Konservierte Strukturelemente wurden rot hervorgehoben.

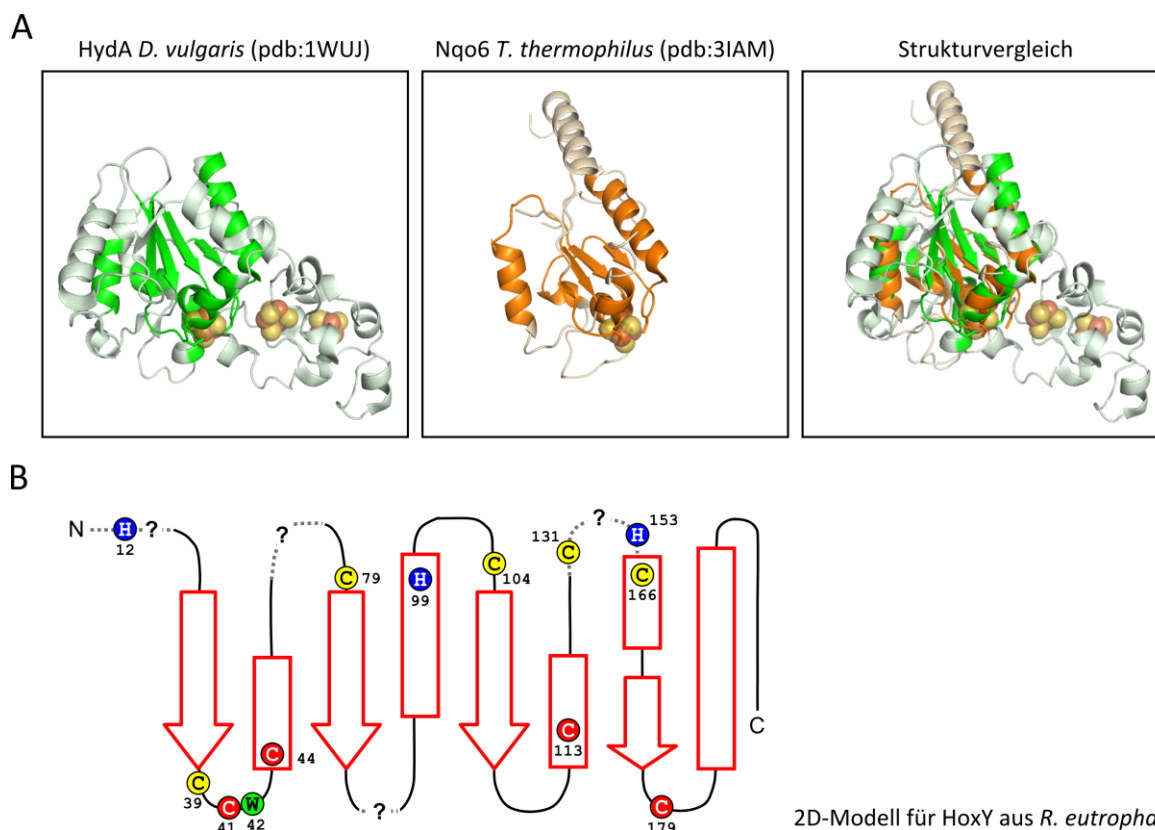


Abb. 29 Ableitung eines 2D-Modells für HoxY aus der Struktur homologer Proteine. (A) Überlagerung der Kristallstrukturen der kleinen Hydrogenaseuntereinheit einer Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenase und der Nqo6-Untereinheit aus Komplex I. Konservierte Sekundärstrukturelemente sind in kräftigen Farben dargestellt. Eisenschwefelcluster sind als Kugeln dargestellt. (B) Topologie-Modell von HoxY aus *R. eutropha* basierend auf dem Sequenzvergleich mit HydA und Nqo6 (siehe auch Abb. 28). Bereich ohne Homologie zu HydA und Nqo6 sind durch ? markiert. Die in dieser Arbeit ausgetauschten Aminosäuren sind dargestellt.

Insgesamt konnten fünf Cystein- und drei Histidinreste identifiziert werden, die ausschließlich in den *R. eutropha*-ähnlichen HoxY-Varianten konserviert sind und somit als potentielle zusätzliche Koordinationsstellen eines ungewöhnlichen FeS-Clusters in Frage kommen (siehe Abb. 28). Um die Relevanz dieser Aminosäurereste für die O₂-Toleranz der SH zu testen, wurden sie einzeln gegen ihre entsprechenden Äquivalente aus den cyanobakteriellen HoxY-Proteinen ausgetauscht. Das Cystein C39 wurde dabei sowohl durch Glycin als auch durch

Alanin und Serin ersetzt. Außerdem wurden die Austausche C79G, C104S, C131V, C166V, H12E, H99E und H153E vorgenommen. Als Kontrolle wurden die hochkonservierten Cysteinreste C41, C44, C113 und C179 sowohl gegen Glycin als auch gegen Serin ausgetauscht. Alle Aminosäureaustausche wurden in dem *R. eutropha*-Stamm H1009 (vgl. 3.3.1.1) etabliert (siehe auch 2.4.3). Im Folgenden werden sowohl die Mutantenstämme als auch die aus diesen Stämmen gereinigten SH-Varianten durch den jeweiligen Aminosäureaustausch in HoxY gekennzeichnet, z.B. SH^{C39G} und SH^{C179S}.

Ein im Rahmen der Bachelorarbeit von Miriam Grunzel etablierter Mutantenstamm, der den Aminosäureaustausch W42S codiert, wurde zusätzlich mit in diese Studie aufgenommen. Die von diesem Stamm produzierte SH^{W42S}-Variante hatte in der vorangegangenen Arbeit trotz sehr guter Protein- und Komplexstabilität keine H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität gezeigt (M. Grunzel, 2012). Die ursprüngliche Hypothese, dass der ausgetauschte Tryptophanrest in die Koordination des für HoxY postulierten FMN-Kofaktors involviert ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Sowohl für den SH^{WT}- als auch für den SH^{W42S}-Komplex wurde ein FMN-Gehalt von 1-1,3 mol FMN mol⁻¹ SH bestimmt (M. Grunzel, 2012). Ob die Bedeutung des Tryptophanrestes W42 für die Hydrogenaseaktivität mit dem nahegelegenen FeS-Cluster (vgl. Abb. 28 und Abb. 29) in Zusammenhang steht, sollte hier näher untersucht werden.

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Ergebnisse zur Charakterisierung der hier eingeführten Mutantenstämme sowie der daraus isolierten SH-Varianten sind zur Übersicht in Tab. S4 im Anhang zusammengefasst.

3.3.2.2 Einfluss der Aminosäureaustausche in HoxY auf das lithoautotrophe Wachstum der Mutantenstämme und die H₂-Oxidationsaktivität der Zellextrakte

Das SH-basierte lithoautotrophe Wachstum der Mutantenstämme wurde in Gegenwart verschiedener O₂-Konzentration (2, 10, 20, 35 % (v/v)) getestet. Hierzu wurden die unter Hydrogenase-reprimierenden Bedingungen synchronisierten Stämme auf Mineralagarplatten ohne organische Kohlenstoffquelle ausgestrichen und unter definierten Atmosphären mit 3 % (v/v) H₂, 10 % (v/v) CO₂ und variablen Anteilen von O₂ und N₂ inkubiert. Nach 5 Tagen erfolgte die Überprüfung des lithoautotrophen Wachstums im Vergleich zum hier als Wildtyp bezeichneten Stamm HF1009. Dabei zeigte sich, dass die Stämme mit Austauschen in den hochkonservierten Cysteinen sowie der SH^{W42S}-Stamm generell nicht zu lithoautotrophen

Wachstum befähigt sind (Tab. 9). Die Mutantenstämme mit Austausch in den für den aeroben Typ spezifischen Cystein- und Histidinresten wuchsen in Gegenwart von 10 % (v/v) O₂ wie der Wildtyp (Tab. 9). Bei 20 % (v/v) O₂ zeigten die Stämme SH^{C39G}, SH^{C39A}, SH^{C104S}, SH^{H12E} und SH^{H153E} dagegen ein verlangsamtes Wachstum, bei 35 % (v/v) O₂ war nur noch der Stamm SH^{C131V} zu Wildtyp-artigem Wachstum befähigt. Dennoch wuchsen auch bei 35 % (v/v) O₂ prinzipiell alle der zuletzt beschriebenen Mutantenstämme, wenn auch in zum Teil stark verminderten Maße. Die deutlichste Inhibition des lithoautotrophen Wachstums durch O₂ wurden bei den Mutantenstämmen SH^{C39G}, SH^{C104S} und SH^{H153E} beobachtet (Tab. 9).

Tab. 9 SH-basiertes lithoautotrophes Wachstum der Mutantenstämme bei steigenden O₂-Konzentrationen. Die synchronisierten Stämme wurden auf Mineralagarplatten ohne organische Kohlenstoffquelle ausgestrichen und unter einer Atmosphäre aus 10 % (v/v) CO₂, 3 % (v/v) H₂, x % (v/v) O₂ und (87-x) % (v/v) N₂ für 5 Tage inkubiert. Das Wachstum wurde im Vergleich zum Wildtypstamm bewertet: ++++ Wildtyp-artiges Wachstum, +++ leicht vermindertes Wachstum, ++ vermindertes Wachstum, + stark vermindertes Wachstum, ø kein Wachstum, - nicht bestimmt. Zusammengefasst sind die Beobachtungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Ein Beispiel der Originaldaten findet sich im Anhang dieser Arbeit (Abb. S5).

	2 % O ₂	10 % O ₂	20 % O ₂	35 % O ₂
SH ^{C39G}	-	++++	++	+
SH ^{C39A}	-	++++	+++	++
SH ^{C39S}	-	++++	++++	+++
SH ^{C79V}	-	++++	++++	+++
SH ^{C104S}	-	++++	+++	+
SH ^{C131V}	-	++++	++++	++++
SH ^{C166V}	-	++++	++++	+++
SH ^{H12E}	-	++++	+++	++
SH ^{H99E}	-	++++	++++	+++
SH ^{H153E}	-	++++	+++	+
SH ^{C41G}	ø	ø	-	-
SH ^{C41S}	ø	ø	-	-
SH ^{C44G}	ø	ø	-	-
SH ^{C44S}	ø	ø	-	-
SH ^{C113G}	ø	ø	-	-
SH ^{C113S}	ø	ø	-	-
SH ^{C179G}	ø	ø	-	-
SH ^{C179S}	ø	ø	-	-
SH ^{W42S}	ø	ø	-	-

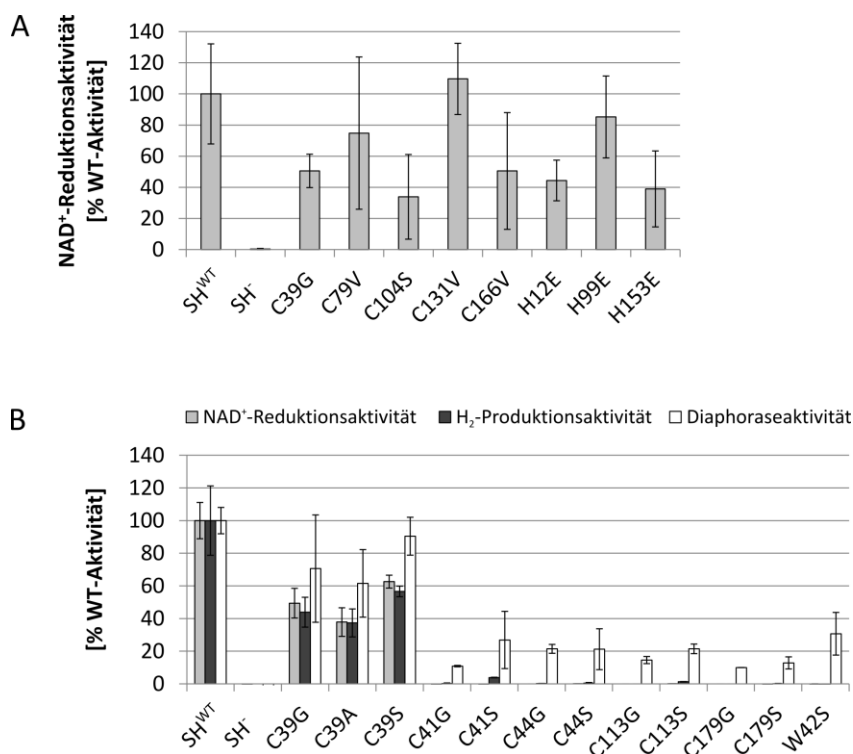


Abb. 30 SH-spezifische Aktivitäten in den Zellextrakten der Mutantenstämme. Die Stämme wurden heterotroph, unter mikroaeroben Bedingungen angezogen. In den löslichen Extrakten (A) bzw. in den durch Zelllyse mit CTAB präparierten Rohextrakten (B) wurden die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität (A+B) sowie die NADH:Benzyldiaphorase (BV)-Oxidoreduktaseaktivität (B, Diaphoraseaktivität) photometrisch bestimmt. Die Methylviologen-abhängige H₂-Produktionsaktivität in den Rohextrakten (B) wurde gaschromatographisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Messreihen. Nicht sichtbare Balken entsprechen Werten von < 1 % der Wildtyp-Aktivität. Die Wildtyp-Aktivitäten lagen bei (A) $3,7 \pm 1,2 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Gesamtprotein und (B) $2,0 \pm 0,2 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein, $0,35 \pm 0,07 \mu\text{mol H}_2 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein und $0,46 \pm 0,04 \mu\text{mol BV min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein.

Um zu untersuchen, ob das Wachstumsverhalten der Mutantenstämme mit deren SH-Aktivitäten korreliert, wurde die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität in Extrakten von heterotroph angezogenen Zellen bestimmt (Abb. 30). Von den Zellen der Stämme SH^{C39G}, SH^{C79V}, SH^{C104S}, SH^{C131V}, SH^{C166V}, SH^{H12E}, SH^{H99E} und SH^{H153E} wurden hierzu lösliche Extrakte präpariert (Abb. 30A). Die Aktivitäten in allen weiteren Stämmen sowie im SH^{C39G}-Stamm wurden in durch Lyse mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) präparierten Zellextrakten bestimmt (Abb. 30B). In den Stämmen, die ein deutlich durch O₂ inhibiertes Wachstum gezeigt hatten (SH^{C39G}, SH^{C39A}, SH^{C104S}, SH^{H12E} und SH^{H153E}), und im SH^{C166V}-Stamm war die NAD⁺-Reduktionsaktivität auf 30-50 % des Wildtyp-Niveaus reduziert (Abb. 30A+B). Die Aktivitäten der Stämmen SH^{H99E}, SH^{C79V} und SH^{C131V} lagen dagegen bei 75-100 % des Wildtyp-Niveaus (Abb. 30A). Eine signifikante Verminderung auf 60 % der Wildtyp-Aktivität war für den SH^{C39S}-Stamm zu beobachten (Abb. 30B). In Übereinstimmung

mit den Wachstumsexperimenten zeigten die Stämme mit Aminosäureaustauschen in einem der konservierten Cysteine sowie der SH^{W42S}-Stamm keine H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität (Abb. 30B). Interessanterweise konnte jedoch für den Mutantenstamm SH^{C41S} eine Methylviologen-abhängige H₂-Produktionsaktivität von 5 % des Wildtyp-Niveaus gemessen werden. Für die Stämme SH^{C39G}, SH^{C39A} und SH^{C39S} wurden H₂-Produktionsaktivitäten von 40-60 % des Wildtyp-Wertes bestimmt (Abb. 30B). Der Rückgang der NADH:Benzyldiaphorase (BV)-Oxidoreduktaseaktivität (Diaphoraseaktivität) auf 10-30 % des Wildtyp-Niveaus in den Stämmen SH^{C41G}, SH^{C41S}, SH^{C44G}, SH^{C44S}, SH^{C113G}, SH^{C113S}, SH^{C179G}, SH^{C179S} und SH^{W42S} (Abb. 30B) deutet auf eine Destabilisierung des gesamten SH-Komplexes durch den jeweiligen Aminosäureaustausch im Hydrogenasemodul hin. Die NADH:BV-Oxidoreduktaseaktivitäten der Stämme SH^{C39G}, SH^{C39A} und SH^{C39S}, die bei 60-90 % des Wildtyp-Niveaus lagen, waren durch die Aminosäureaustausche in HoxY weniger stark beeinflusst (Abb. 30B).

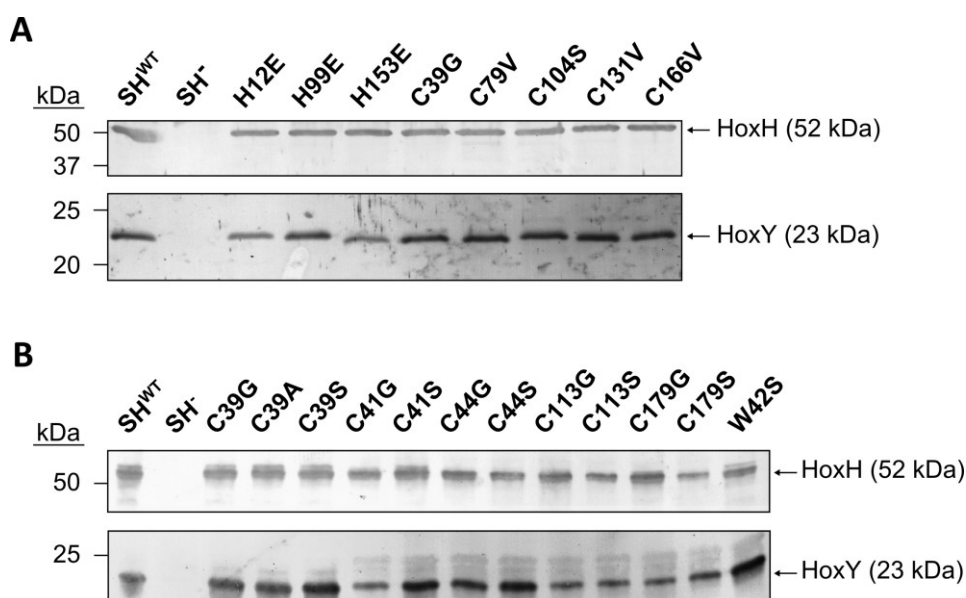


Abb. 31 Immunologischer Nachweis von HoxY und HoxH in den Mutantenstämmen. Die Mutanten- und Kontrollstämme (HF1009, HF210) wurden heterotroph, unter mikroaeroben Bedingungen angezogen. Proteine des löslichen Extrakts (A, 4 µg Gesamtprotein) oder des Rohextrakts (B, Äquivalente von 9,5 µg Gesamtprotein) wurden im 12 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit HoxY- bzw. HoxH-spezifischen Antikörpern detektiert.

Durch *Western Blot*-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle Stämme beide Untereinheiten, HoxH und HoxY, des SH-Hydrogenasemoduls produzieren (Abb. 31). Während die Konzentration des HoxH-Proteins von den Aminosäureaustauschen unbeeinflusst war, wurden in den Stämmen SH^{H12E}, SH^{H153E}, SH^{C41G}, SH^{C113G}, SH^{C113S}, SH^{C179G} und SH^{C179S} geringere Mengen an HoxY detektiert (Abb. 31), was auf eine Destabilisierung dieser Untereinheit durch die Aminosäureaustausche hindeutet.

Zur besseren Unterscheidung von Effekten, die auf einer veränderten Komplexstabilität bzw. auf einer reduzierten spezifischen Aktivität der SH-Varianten beruhen, sollten die modifizierten SH-Varianten im Folgenden gereinigt und *in vitro* charakterisiert werden.

3.3.2.3 Biochemische Charakterisierung der gereinigten SH-Varianten

Für die weitere Charakterisierung wurden die SH-Varianten aus heterotroph, unter mikroaeroben Bedingungen angezogenen Zellen der Mutantenstämme isoliert. Auf die Reinigung der voraussichtlich inaktiven SH-Komplexe SH^{C44G}, SH^{C113G} und SH^{C179G} wurde hierbei verzichtet.

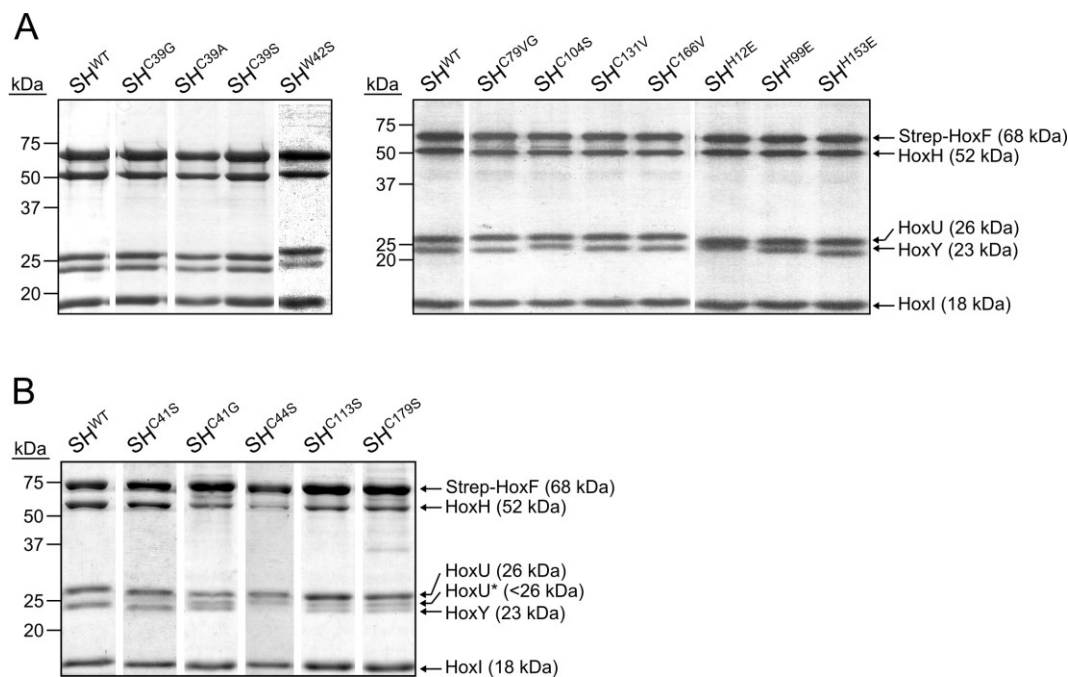


Abb. 32 Über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigte SH-Varianten. Je 5 µg Proteinkomplex wurden mittels SDS-PAGE (12 % bzw. 15 %) aufgetrennt und durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. (A) SH-Varianten mit einem Austausch in einer für den *R. eutropha*-Typ spezifischen Aminosäure (B) SH-Varianten mit einem Aminosäureaustausch in einem der hochkonservierten Cysteinreste

Die SH-Varianten, in denen ein *R. eutropha*-spezifischer Cystein- bzw. Histidinrest ausgetauscht wurde, konnten in Wildtyp-ähnlichen Mengen mit normaler Untereinheiten-Stöchiometrie gereinigt werden (Abb. 32A). Die HoxY-Untereinheiten der SH^{C104S}-, SH^{H12E}- und SH^{H99E}-Komplexe zeigten dabei ein leicht verändertes Laufverhalten (vgl. Abb. 32). Die NAD⁺-Reduktionsaktivitäten individueller Präparationen einer SH-Variante variierten zum Teil um mehr als 30 % (vgl. Tab. 10). Für die Varianten SH^{C39G}, SH^{C39A} und SH^{C104S} konnte eine signifikante Reduktion der Aktivität auf 32, 43 bzw. 71 % der Wildtyp-Aktivität

beobachtet werden (Tab. 10). Für die SH^{C39G}- und SH^{C39A}-Komplexe wurde außerdem eine im Vergleich zum Wildtyp-Komplex auf 18-29 % reduzierte H₂-Produktionsaktivität gemessen (Tab. 10). Interessanterweise lag die mittlere NAD⁺-Reduktionsaktivität der SH^{C131V}-Präparationen deutlich über der mittleren Wildtyp-Aktivität (Tab. 10). Diese Tendenz hatte sich bei den Aktivitätsmessungen im löslichen Extrakt schon angedeutet (vgl. Abb. 30) und deutet auf eine mögliche Hyperaktivität dieser SH-Variante hin.

Tab. 10 NAD⁺-Reduktions- und H₂-Produktionsaktivitäten der gereinigten SH-Varianten. Die NAD⁺-Reduktionsaktivitäten wurden photometrisch in Gegenwart von 1 mM DTT und 1 μ M FMN bestimmt. Ein Unit (1 U) entspricht der Bildung von 1 μ mol NADH min⁻¹. Etwa 0,7 μ g bzw. 7-15 μ g Enzym wurden für die Messungen mit aktiven (>10 U mg⁻¹) bzw. geringfügig aktiven (<10 U mg⁻¹) SH-Komplexen eingesetzt. Die Methylviologen-abhängige H₂-Produktion wurde gaschromatographisch bestimmt. Ein Unit (1 U) entspricht der Bildung von 1 μ mol H₂ min⁻¹. Etwa 1,2 μ g bzw. 10-20 μ g Enzym wurden für die Messungen mit aktiven (>1,5 U mg⁻¹) bzw. geringfügig aktiven (<1,5 U mg⁻¹) SH-Komplexen eingesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Präparationen der jeweiligen SH-Variante.

	Aminosäure- austausch ¹	H ₂ -abhängige NAD ⁺ -Reduktionsaktivität [U mg ⁻¹ SH]	MV-abhängige H ₂ -Produktionsaktivität [U mg ⁻¹ SH]
SH ^{WT}	-	115,9 \pm 17,4	11,2 \pm 2,0
SH ^{C39G}	A	36,3 \pm 2,7	2,0 \pm 0,9
SH ^{C39A}	A	57,1 \pm 4,9	3,3 \pm 0,2
SH ^{C39S}	A	96,0 \pm 8,0	-
SH ^{C79V}	A	102,7 \pm 34,1	-
SH ^{C104S}	A	82,7 \pm 13,3	-
SH ^{C131V}	A	134,4 \pm 20,5	-
SH ^{C166V}	A	119,4 \pm 24,6	-
SH ^{H12E}	A	98,0 \pm 17,7	-
SH ^{H99E}	A	109,7 \pm 82,8	-
SH ^{H153E}	A	91,7 \pm 26,5	-
SH ^{C41S}	C	8,7 \pm 5,9	1,1 \pm 0,3
SH ^{C41G}	C	0,9 \pm 0,7	0,2 \pm 0,1
SH ^{C44S}	C	0,4 \pm 0,1	<0,1
SH ^{C113S}	C	0,9 \pm 0,1	<0,1
SH ^{C179S}	C	0,6 \pm 0,5	<0,1
SH ^{W42S}	A	0,1 \pm 0,0	<0,1

¹ C: Austausch eines hochkonservierten Cysteins, A: Austausch einer *R. eutropha*-Typ-spezifischen Aminosäure

Der SH^{W42S}-Komplex konnte ebenfalls in Wildtyp-ähnlichen Mengen und mit einer ausgewogenen Untereinheiten-Stöchiometrie gereinigt werden (Abb. 32.). Trotz der guten Stabilität konnte nur eine minimale NAD⁺-Reduktionsaktivität von weniger als 0,1 % der Wildtyp-Aktivität und keine MV-abhängige H₂-Produktion für diese SH-Variante detektiert werden (Tab. 10). Die Ausbeuten für die SH-Varianten SH^{C41S}, SH^{C41G}, SH^{C44S}, SH^{C113S} und SH^{C179S} lagen bei nur etwa 25 % des Wildtyp-Niveaus. Während der SH^{C41S}-Komplex nur

leicht reduzierte Anteile von HoxH und HoxY aufwies, war die Untereinheiten-Stöchiometrie der anderen SH-Varianten deutlich gestört (Abb. 32B). Neben verminderten Anteilen von HoxH und HoxY zeichneten sich diese SH-Komplexe durch die HoxU-Doppelbande aus (Abb. 32B), die unter 3.3.1.3 als charakteristisch für die Abwesenheit von HoxY beschrieben wurde. Unter Standardbedingungen konnte für diese SH-Varianten, einschließlich SH^{C41S} , keine NAD^+ -Reduktionsaktivität gemessen werden. Bei hohen Proteinkonzentrationen und nach einer ungewöhnlich langen Reaktivierungsphase von mehr als 30 Minuten war jedoch für die Präparationen des SH^{C41S} -Komplexes eine NAD^+ -Reduktionsaktivität von 5-10 % des Wildtyp-Wertes zu beobachten (Tab. 10, siehe auch 3.3.2.4). Auch die MV-abhängige H_2 -Produktion lag für das SH^{C41S} -Protein bei etwa 10 % der Wildtyp-Aktivität (Tab. 10). Unter den gleichen Bedingungen zeigten sich auch für die SH^{C41G} -, SH^{C44S} -, SH^{C113S} - und SH^{C179S} -Komplexe geringe NAD^+ -Reduktionsaktivitäten, die jedoch unter 1 % der Wildtyp-Aktivität lagen (Tab. 10). Die H_2 -Produktionsaktivitäten dieser Varianten lagen im Bereich der oder bereits unter der Detektionsgrenze (Tab. 10).

Von den als homogene Komplexe gereinigten SH-Varianten wurde der FMN-Gehalt bestimmt (Abb. 33). Für die verschiedenen Präparationen wurden dabei Werte zwischen 0,8 und 1,4 mol FMN pro SH-Komplex ermittelt. Im Mittel konnte jedoch für keine der SH-Varianten ein signifikanter Unterschied zum FMN-Gehalt in der Wildtyp-SH beobachtet werden.

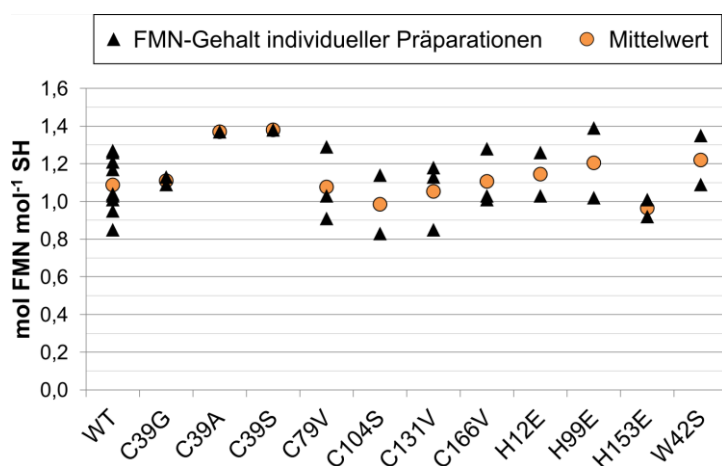


Abb. 33 FMN-Gehalt der gereinigten SH-Varianten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die SH^{C39G} - (und SH^{C39A} , SH^{C39S}), SH^{C41S} - und SH^{W42S} -Komplexe interessante Phänotypen besitzen, die sich durch verringerte bzw. fehlende SH-spezifische Aktivitäten bei guter bis sehr guter Komplexstabilität auszeichnen.

3.3.2.4 Der SH^{C41S}-Komplex zeigt eine verlangsamte Reaktivierungskinetik

Um die Bedingungen, unter denen der SH^{C41S}-Komplex eine NAD⁺-Reduktionsaktivität zeigt, näher zu untersuchen, wurden Kinetiken der NADH-Produktion durch die SH^{C41S}- und SH^{WT}-Proteine unter verschiedenen Versuchsbedingungen aufgezeichnet (Abb. 34).

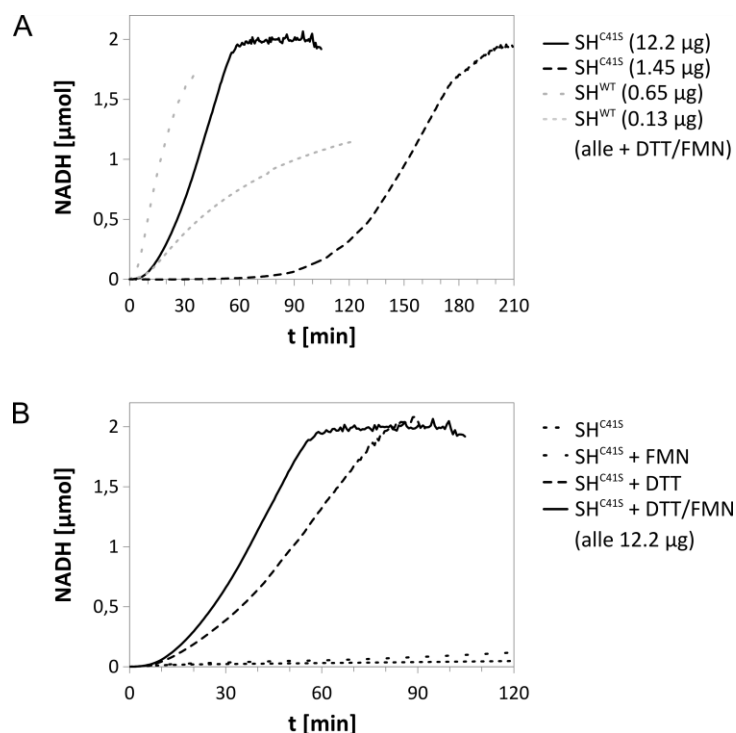


Abb. 34 Kinetiken der H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktion durch den SH^{C41S}-Komplex. Die NADH-Produktion wurde photometrisch verfolgt. FMN und DTT wurden in Konzentrationen von 1 μM bzw. 1 mM eingesetzt. (A) vergleicht Ansätze mit unterschiedlichen Mengen an SH^{C41S}- bzw. SH^{WT}-Komplex. (B) zeigt die Einflüsse der Zusätze (FMN, DTT). Dargestellt sind repräsentative Kinetiken wiederholter Messungen.

Eine NAD⁺-Reduktionsaktivität des SH^{C41S}-Komplexes konnte nur nach ungewöhnlich langen Anlauf(lag)-Phasen von 30-150 min beobachtet werden (vgl. Abb. 34A). Diese lag-Phasen verkürzten sich, wenn die Enzymmenge erhöht wurde (Abb. 34A), was auf einen autokatalytischen Reaktivierungsmechanismus hindeutet. Während sich beim WT-Enzym die Verringerung der eingesetzten SH-Menge negativ auf die Dauer der Phase maximaler Aktivität auswirkte, wurden für das SH^{C41S}-Protein bei geringeren Enzymkonzentrationen sogar höhere spezifische Aktivitäten bestimmt. Vermutlich kann unter diesen Bedingungen ein größerer Anteil der SH^{C41S}-Komplexe reaktiviert werden, bevor es zur Substratlimitation im Versuchsansatz kommt. Es zeigte sich weiterhin, dass die Aktivität des SH^{C41S}-Komplexes von der Gegenwart des milden Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) abhängig ist (Abb. 34B, Tab. 11). Dieses konnte durch andere Reduktionsmittel wie Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP) oder β-Mercaptoethanol (β-EtSH) ersetzt werden, was jedoch

in geringeren Aktivitäten resultierte (Tab. 11). Wie beim Wildtyp-Enzym hatte die Zugabe von Flavin-Mononukleotid (FMN) einen positiven Effekt auf die Aktivität. FMN allein war jedoch nicht ausreichend, um eine Reaktivierung des SH^{C41S}-Komplexes anzustoßen (Abb. 34B, Tab. 11).

Tab. 11 NAD⁺-Reduktionsaktivitäten von drei unabhängigen Präparationen des SH^{C41S}-Komplexes. Die Aktivitäten wurden photometrisch bestimmt. Ein Unit (1 U) entspricht der Produktion von 1 µmol NADH min⁻¹. Wenn angegeben wurde FMN in einer finalen Konzentration von 1 µM bzw. DTT (Dithiothreitol), TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid) oder β-EtSH (β-Mercaptoethanol) in einer Konzentrationen von 1 mM hinzugegeben. Maximale NADH-Produktionsraten wurden 30-200 min nach Zugabe des Enzyms (7-15 mg SH-Komplex) beobachtet. Kontrollen ohne H₂ im Ansatz zeigten keine Akkumulation von NADH.

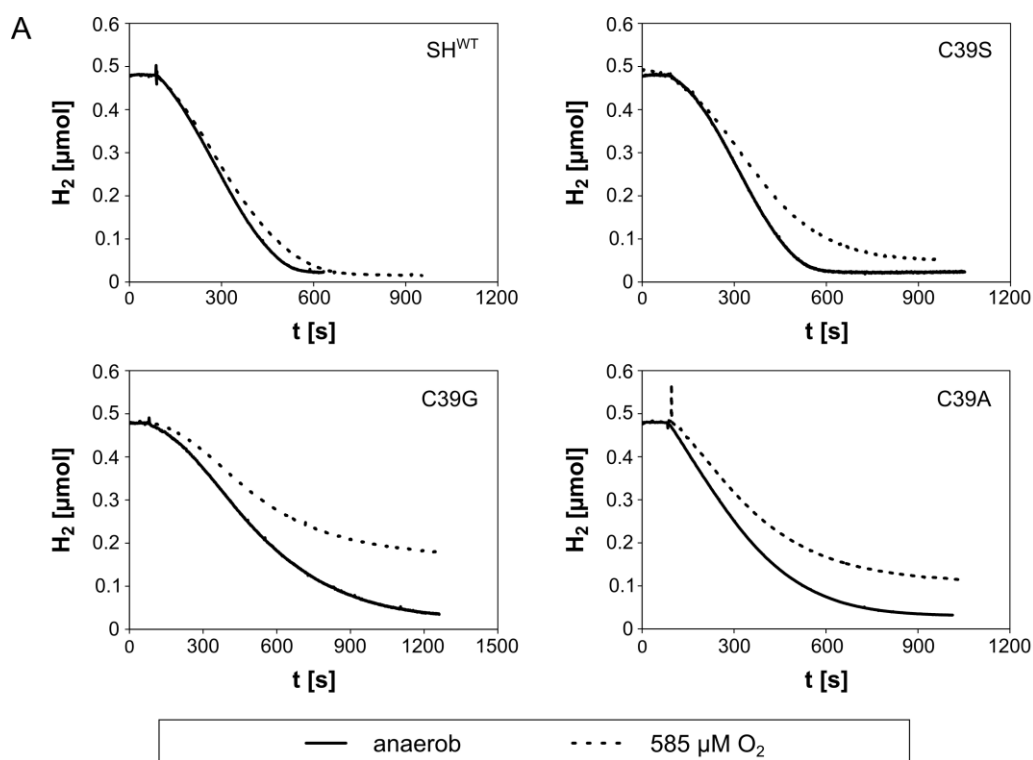
	NAD ⁺ -Reduktionsaktivität [U mg ⁻¹ SH]					
	ohne Zusätze	+ FMN	+ DTT	+ DTT/FMN	+ TCEP/FMN	+ β-EtSH/FMN
Präp A	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	13.2 ± 1.2	2.8 ± 2.4	5.7 ± 0.5
Präp B	n.d.	0.0 ± 0.0	5.1 ± 0.9	6.9 ± 0.0	3.6 ± 0.5	4.7 ± 0.1
Präp C	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.6 ± 0.4	3.7 ± 0.3	2.3 ± 0.9	2.7 ± 0.6

n.d. – nicht bestimmt

Wie aus Tab. 11 zu erkennen ist, variierten die NAD⁺-Reduktionsaktivitäten verschiedener Präparationen der SH^{C41S}-Variante sehr stark. Eine Reinigung im für spektroskopische Untersuchungen benötigten Maßstab nach dem für die anderen SH-Varianten verwendeten Protokoll hatte zunächst nur einen völlig inaktiven SH^{C41S}-Komplex geliefert. Erst die parallele Anzucht der Zellen in 500 ml-Schikanekolben und die parallele Reinigung kleinerer Volumina mit den daraus resultierenden verkürzten Präparationszeiten erlaubten die Isolation der Präparation C mit einer Aktivität von 3,7 U mg⁻¹. Diese wurde für die spektroskopische Charakterisierung der SH^{C41S}-Variante eingesetzt (siehe 3.3.2.6 und 3.3.2.7).

3.3.2.5 Aminosäureaustausche an der Position C39 führen zu erhöhter Sauerstoffempfindlichkeit der SH

Für die SH-Varianten SH^{C39G}, SH^{C39A} und SH^{C39S} wurde der Einfluss von O₂ auf die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität untersucht. Um definierte Gemische der Gase H₂, N₂ bzw. O₂ im Reaktionsansatz einstellen zu können, wurde mit der invertierten Clark-Elektrode gearbeitet. Die Architektur der Reaktionskammer ermöglicht ein Arbeiten ohne Gasphase über dem Reaktionsansatz. Durch amperometrische Messung des H₂-Verbrauches wurden die Aktivitäten in Abwesenheit (50 % N₂-gesättigter Puffer/ 50 % H₂-gesättigter Puffer) und Anwesenheit von Sauerstoff (50 % O₂-gesättigter Puffer/ 50 % H₂-gesättigter Puffer; 585 µM O₂) bestimmt (Abb. 35).



B

SH-Variante	NAD ⁺ -Reduktionsaktivität in Abwesenheit von O ₂ [U mg ⁻¹ SH]	NAD ⁺ -Reduktionsaktivität in Gegenwart von O ₂ [U mg ⁻¹ SH]	Verhältnis Aktivität in Gegenwart von O ₂ / Aktivität in Abwesenheit von O ₂
SH ^{WT}	117 ± 12	111 ± 11	0.95
SH ^{C39G}	24 ± 1	19 ± 4	0.80
SH ^{C39A}	54 ± 4	36 ± 1	0.66
SH ^{C39S}	60 ± 3	46 ± 5	0.76

Abb. 35 Einfluss von O₂ auf die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität der SH-Varianten. Der Verbrauch von H₂ in Abwesenheit (1:1-Mischung aus H₂- und N₂-gesättigtem Puffer) und Anwesenheit (1:1-Mischung aus H₂- und O₂-gesättigtem Puffer) von O₂ wurde mit einer invertierten Clark-Elektrode verfolgt. (A) zeigt repräsentative Kinetiken. Enzym (je 75 mU) wurde nach 120 s zugegeben. (B) zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens drei Messungen. Ein Unit (1 U) entspricht einem Verbrauch von 1 $\mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1}$.

Während die NAD⁺-Reduktionsaktivität des SH^{WT}-Proteins, wie schon in früheren Arbeiten beobachtet (Schneider und Schlegel, 1981, Lauterbach und Lenz, 2013), durch O₂ kaum beeinflusst wurde, war für die drei eingesetzten SH-Varianten eine deutliche Abnahme der Aktivitäten in Gegenwart von O₂ zu erkennen (vgl. Abb. 35). Die in Abwesenheit von O₂ gemessenen Aktivitäten von 21 % (SH^{C39G}), 46 % (SH^{C39A}) bzw. 51 % (SH^{C39S}) des Wildtyp-Llevels verringerten sich bei Zugabe von O₂ nochmals um 20-30 % (Abb. 35B). Außerdem zeigte sich, dass die SH^{C39G/A/S}-Varianten in Gegenwart von O₂ nicht den gesamten gelösten Wasserstoff umsetzen (Abb. 35A). Dies deutet auf eine Inaktivierung der Enzymkomplexe während der Katalyse in Gegenwart von O₂ hin.

3.3.2.6 Spektroskopische Charakterisierung ausgewählter SH-Varianten mittels UV-vis-Absorptions- und EPR-Spektroskopie

Die in der biochemischen Charakterisierung auffälligen SH-Varianten SH^{C39G}, SH^{C39S}, SH^{C41S} und SH^{W42S} sollten im Folgenden in Zusammenarbeit mit der AG Hildebrandt von der TU Berlin spektroskopisch charakterisiert werden. Mittels UV-vis-Absorptions- und Elektronenspinresonanz-(EPR – für *electron paramagnetic resonance*)-Spektroskopie sollte hierbei untersucht werden, ob die Aminosäureaustausche in HoxY zu einer Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften des Enzyms führen. Der FeS-Cluster in HoxY hatte in vorangegangenen EPR-Untersuchungen am wildtypischen SH-Komplex, möglicherweise durch Kopplung mit einem nahegelegenen paramagnetischen Zentrum, keine Signale gezeigt (Lauterbach *et al.*, 2011b, Horch *et al.*, 2012). Sollte es sich bei dem postulierten Kopplungspartner um das aktive [NiFe]-Zentrum in HoxH handeln, wären durch eine Aufhebung des EPR-inaktiven Zustands eventuell auch neue Erkenntnisse über das aktive Zentrum zu erwarten.

Die UV-vis-Absorptionsspektren der SH-Varianten zeigten in dem für die Absorption durch FeS-Cluster charakteristischen Bereich von 320 nm bis 500 nm keine erkennbaren Unterschiede zum Spektrum der Wildtyp-SH (Abb. 36). Geringfügige Veränderung in der durch das HoxY-Cluster hervorgerufenen Absorption könnten jedoch durch die unverändert starke Absorption der für das NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul postulierten Kofaktoren, ein [2Fe2S]-Cluster und drei [4Fe4S]-Cluster, überlagert worden sein.

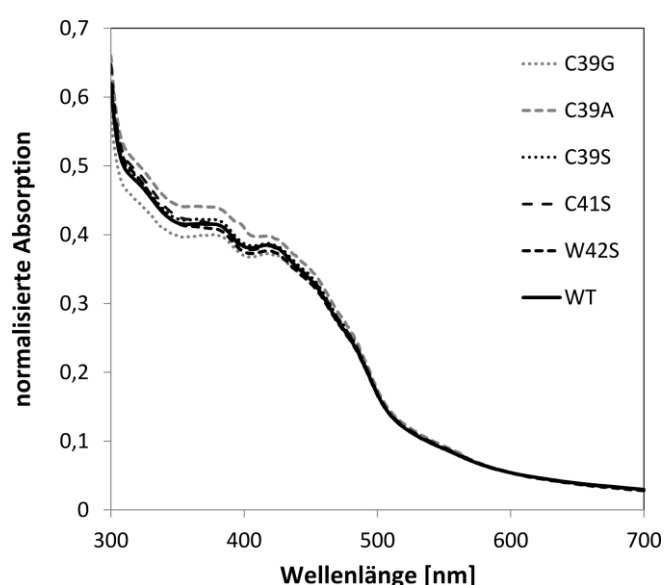
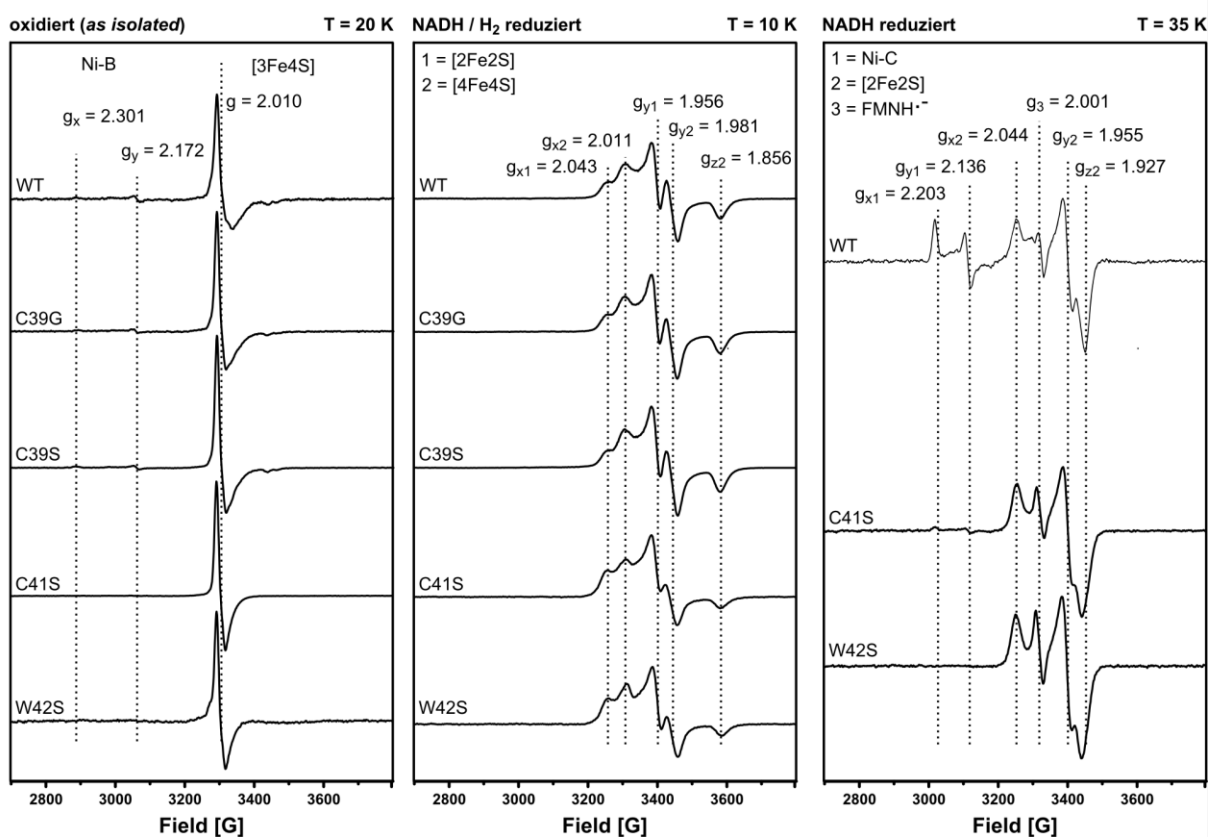


Abb. 36 UV-vis-Absorptionsspektren des SH^{WT}-Komplexes und verschiedener SH-Varianten im luftoxidierten Zustand. Die Spektren wurden auf eine Proteinkonzentration von 1 mg ml⁻¹ normalisiert.

Die EPR-Messungen wurden von Dr. Friedhelm Lenzian, Marius Horch und Stefan Wahlefeld am Max-Volmer-Laboratorium der TU Berlin durchgeführt und ausgewertet. Es wurden 9,5 GHz-X-Band-Spektren der unbehandelten, luftoxidierten SH-Komplexe (*as isolated*) sowie von H₂/NADH-reduzierten und nur NADH-reduzierten Proben aufgezeichnet (Abb. 37). Die EPR-Spektren aller oxidierten Proteinproben ähneln sich. Sie zeigen ein Signal bei $g = 2.010$, das einem [3Fe4S]⁺-Cluster zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 37A). Die Spin-Quantifizierung zeigt jedoch, dass dieses Signal nur einem Anteil von etwa 10 % der SH-Komplexe entspricht (Abb. 37B). Wie schon in früheren Arbeiten lässt sich dieses Signal somit als oxidative Schädigung eines oder mehrerer [4Fe4S]-Cluster interpretieren (Horch *et al.*, 2012). In diesem Kontext ist es interessant, dass für den SH^{C41S}-Komplex die Signalintensität auf 18 % erhöht ist, was auf das FeS-Cluster in HoxY als Ort der oxidativen Schädigung hindeutet (Abb. 37B). Weiterhin zeigen die Spektren der SH^{C39G}-, des SH^{C39S}- und des SH^{WT}-Proteine Spuren eines Signals (2-3 %), das dem paramagnetischen „Ni-B“-Zustand des aktiven [NiFe]-Zentrums zugeordnet werden kann (Abb. 37). Dieser durch einen verbrückenden Hydroxyl-Liganden zwischen dem Ni³⁺- und dem Fe²⁺-Ion charakterisierte Zustand des aktiven Zentrums konnte erst in jüngeren EPR-Studien in SH^{WT}-Proben nachgewiesen werden (Marius Horch, Lars Lauterbach und Dr. Friedhelm Lenzian, persönliche Kommunikation). Die physiologische Relevanz dieses Zustands ist aufgrund des substöchiometrischen Auftretens noch unklar. In den Spektren der SH^{C41S}- und SH^{W42S}-Varianten wurde kein „Ni-B“-Signal detektiert (Abb. 37).

Die EPR-Spektren der mit H₂ und NADH reduzierten Proben zeigten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den vier SH-Varianten und dem wildtypischen SH-Komplex. Signale, die laut Spin-Quantifizierung einem [2Fe2S]⁺- und einem [4Fe4S]⁺-Cluster zugeordnet werden können, dominieren diese Spektren (Abb. 37). Dies belegt, dass die Mehrzahl der für die SH postulierten [4Fe4S]-Cluster unter diesen Bedingungen offensichtlich EPR-inaktiv ist. Das Spektrum einer zusätzlichen mit 10 mM DTT reduzierten SH^{C41S}-Probe zeigte keinen Unterschied zu dem Spektrum der NADH/H₂-reduzierten Probe (F. Lenzian - persönliche Kommunikation). Nach Reduktion mit NADH zeigten sich deutliche Unterschiede in den EPR-Spektren der SH^{WT}-, SH^{C41S}- und SH^{W42S}-Komplexe. Unter diesen Reduktionsbedingungen akkumulierte in der Probe des SH^{WT}-Komplexes ein als „Ni-C“ bezeichneter Zustand, der durch einen Hydrid-Liganden in der Brückenposition zwischen dem Ni³⁺- und dem Fe²⁺-Ion des aktiven Zentrums charakterisiert ist (Brecht *et al.*, 2003, Lacey *et al.*, 2007). Laut Spin-Quantifizierung befinden sich bis zu 65 % der SH^{WT}-Komplexe in diesem Zustand (Abb. 37). Für die Probe der SH^{C41S}-Variante liegt der Anteil bei nur 7-8 %

A



B

	oxidiert (<i>as isolated</i>)		NADH/H ₂ -reduziert		NADH-reduziert ³	
	Ni-B	[3Fe4S]	[2Fe2S] ¹	[4Fe4S] ²	[2Fe2S] ¹	Ni-C
SH ^{WT}	3 %	10 %	100 %	60 %	100 % (45 %) ⁴	65 % (29 %) ⁴
SH ^{C39G}	2-3 %	12 %	100 %	60 %	n.d.	n.d.
SH ^{C39S}	2-3 %	12 %	100 %	60 %	n.d.	n.d.
SH ^{C41S}	< 2 %	19 %	100 %	60 %	100 %	7-8 %
SH ^{W42S}	< 2 %	11 %	100 %	60 %	100 %	< 2 %

Abb. 37 EPR-Spektren der SH-Varianten SH^{C39G}, SH^{C39S}, SH^{C41S} und SH^{W42S} im Vergleich zum SH^{WT}-Komplex. (A) Spektren der unbehandelten, luftoxidierten Proben (*as isolated*) wurden bei 20 K aufgezeichnet (linker Teil). Zur Reduktion mit NADH/H₂ wurden 5 mM NADH zur Proteinlösung gegeben und die Proben 30 min unter H₂-Atmosphäre inkubiert. Spektren dieser Proben wurden bei 10 K (mittlerer Teil) aufgezeichnet. Zur Reduktion mit NADH wurden den Proteinlösungen 10 mM NADH in einer H₂-freien Atmosphäre zugesetzt. Die Spektren wurden bei 35 K aufgezeichnet (rechter Teil). Die Zuordnung der Signale basierend auf den charakteristischen g-Werten ist angegeben. Die Quantifizierung der Signalintensitäten ist in (B) zusammengefasst. ¹Die Signalintensitäten der [2Fe2S]-Cluster im ungekoppelten Zustand (> 20 K) wurden als Referenzwert für 1 Spin pro Proteinkomplex (= 100 %) verwendet. Die Fehlerspanne liegt bei 2 %. Die Abwesenheit eines eindeutigen Signals wurde als < 2 % angegeben. ²Signalintensitäten der [4Fe4S]-Cluster in den bei 10 K-aufgezeichneten Spektren ³Die einem Semichinon-Radikal entsprechenden Signale bei g = 2.01 wurden nicht quantifiziert. ⁴Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutet auf eine unvollständige Reduktion dieser Probe hin. n.d. – nicht bestimmt

und für die SH^{W42S}-Variante konnte kein „Ni-C“ nachgewiesen werden (Abb. 37). Die vollständige Reduktion des [2Fe2S]-Clusters und das Auftreten eines Flavin-spezifischen Semichinon-Signals deuten jedoch daraufhin, dass in der SH^{W42S}-Probe wie in den anderen beiden Proben das NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul der SH noch funktionsfähig ist (Abb. 37).

Zusammenfassend konnten im Hinblick auf die FeS-Cluster-spezifischen Signale nur wenige Unterschiede zwischen den SH-Varianten und dem SH^{WT}-Protein beobachtet werden. Die SH^{C41S}- und SH^{W42S}-Komplexe zeigten jedoch Veränderungen in den EPR-aktiven Zuständen des katalytischen [NiFe]-Zentrums. Zur ergänzenden Charakterisierung der Redoxzustände des [NiFe]-Zentrums in den SH-Varianten wurde im Folgenden Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Schwingungsspektroskopie eingesetzt.

3.3.2.7 FTIR-Untersuchungen an den aktiven [NiFe]-Zentren der ausgewählten SH-Varianten

Zur Komplettierung der spektroskopischen Charakterisierung der SH-Varianten wurden Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Schwingungsspektren der unbehandelten (*as isolated*), der H₂/NADH- sowie der nur NADH-reduzierten SH-Proben aufgenommen (Abb. 38). Diese Form der spektroskopischen Untersuchung ermöglicht die Differenzierung von Redoxzuständen des aktiven [NiFe]-Zentrums anhand der charakteristischen Streckschwingungen der diatomaren Liganden (1 CO, 2 CN⁻) am Fe²⁺-Ion des aktiven Zentrums. Somit sollte geklärt werden, inwieweit sich die Aminosäureaustausche in HoxY auch auf das in HoxH lokalisierte aktive [NiFe]-Zentrum auswirken.

Die hier gezeigten FTIR-Spektren wurden von Stefan Wahlefeld und Marius Horch am Max-Volmer-Laboratorium der TU Berlin aufgenommen und ausgewertet. Eine weiterreichende Interpretation der FTIR-Spektren findet sich auch in der Masterarbeit von Stefan Wahlefeld (S. Wahlefeld, 2013). Das Spektrum der unbehandelten, luftoxidierten SH^{WT}-Probe zeigt vier Banden (2099, 2089, 2079, 2068 cm⁻¹) in dem für die CN⁻-Liganden charakteristischen Bereich und eine CO-spezifische Bande bei 1957 cm⁻¹ (Abb. 38). Dieses bereits in früheren Arbeiten beobachtete Spektrum wird nach dem aktuellen Modell als Überlagerung zweier oxidierten Spezies des aktiven [NiFe]-Zentrums mit identischen CO-Streckschwingungen aber unterschiedlichen CN⁻-Schwingungen interpretiert (M. Horch – persönliche Information). Nach Reduktion mit NADH und H₂ wurden Banden bei 2052, 1946, 1922 und 1913 cm⁻¹ im Spektrum der Wildtyp-SH sichtbar (Abb. 38). Diese sind charakteristisch für die katalytisch

aktiven Zustände des SH-Komplexes, Ni-SR, Ni-SR' und Ni-SR'' (vgl. Horch *et al.*, 2010). Das Spektrum des NADH-reduzierten SH^{WT}-Komplexes wird von den durch CO-Streckschwingungen bei 1961, 1958 und 1946 cm⁻¹ charakterisierten Ni-C, Ni-SR2 bzw. Ni-SR-Spezies dominiert (vgl. Horch *et al.*, 2010). Die Spektren der SH^{C39G}- und der SH^{C39S}-Proteine waren sowohl für die oxidierten als auch für die H₂/NADH-reduzierten Proben identisch mit dem Spektrum der Wildtyp-SH (Abb. S6). Auch das FTIR-Spektrum der unbehandelten SH^{C41S}-Probe entspricht dem Wildtyp-Spektrum, wobei die beiden hochfrequenten CN⁻-Banden (2096, 2087 cm⁻¹) leicht zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben waren (Abb. 38). In Spektren der H₂/NADH- und H₂/NADH/DTT-reduzierten SH^{C41S}-Proben zeichneten sich die für die Ni-SR-, Ni-SR'- und Ni-SR''-Zustände charakteristischen Banden ab, jedoch in einem sehr viel schwächeren Maße als bei der Wildtyp-SH. Ein geringerer Anteil an [NiFe]-Zentren, die sich in einem katalytischen aktiven Zustand befinden, entspricht den Beobachtungen aus der biochemischen Charakterisierung des SH^{C41S}-Komplexes (vgl. 3.3.2.3). Für den NADH-reduzierten SH^{C41S}-Komplex konnten keine Ni-C- und Ni-SR-spezifischen Banden beobachtet werden (Abb. 38). Auch die Zuordnung der im Spektrum auftretenden Banden bei 2087, 2077, 2068 und 1956 cm⁻¹ zum Ni-SR2-Zustand ist nicht eindeutig (Abb. 38). Das Verschwinden der CN⁻-Bande bei 2098 cm⁻¹ (vgl. Abb. 38) im Vergleich zum Spektrum des unbehandelten SH^{C41S}-Komplexes deutet jedoch darauf hin, dass auch unter diesen milden Reduktionsbedingungen Ladungs- und/oder Strukturänderungen am aktiven [NiFe]-Zentrum des SH^{C41S}-Komplexes stattfinden.

Das Spektrum der unbehandelten SH^{W42S}-Probe weicht deutlich von denen der anderen SH-Varianten ab (Abb. 38). Das Vorhandensein von mindestens zwei CN⁻-spezifischen Banden (2073, 2055 cm⁻¹) und zwei CO-spezifischen Banden (1957-1956, 1938 cm⁻¹) weist auf eine Überlagerung von Signalen verschiedener Zustände des [NiFe]-Zentrums hin. Die Wellenzahlen dieser Banden können jedoch mit keiner aus den FTIR-Spektren des Wildtyps bekannten Spezies korreliert werden. Weiterhin zeigen die Spektren der reduzierten SH^{W42S}-Proben keine Veränderungen gegenüber dem Spektrum der luftoxidierten, unbehandelten Probe (Abb. 38). Es stellte sich deshalb die Frage, inwieweit das katalytische [NiFe]-Zentrum dieser SH-Variante noch in der Lage ist, mit H₂ zu interagieren. Dieser Fragestellung sollte im Folgenden mit H₂/D⁺-Austausch-Experimenten nachgegangen werden.

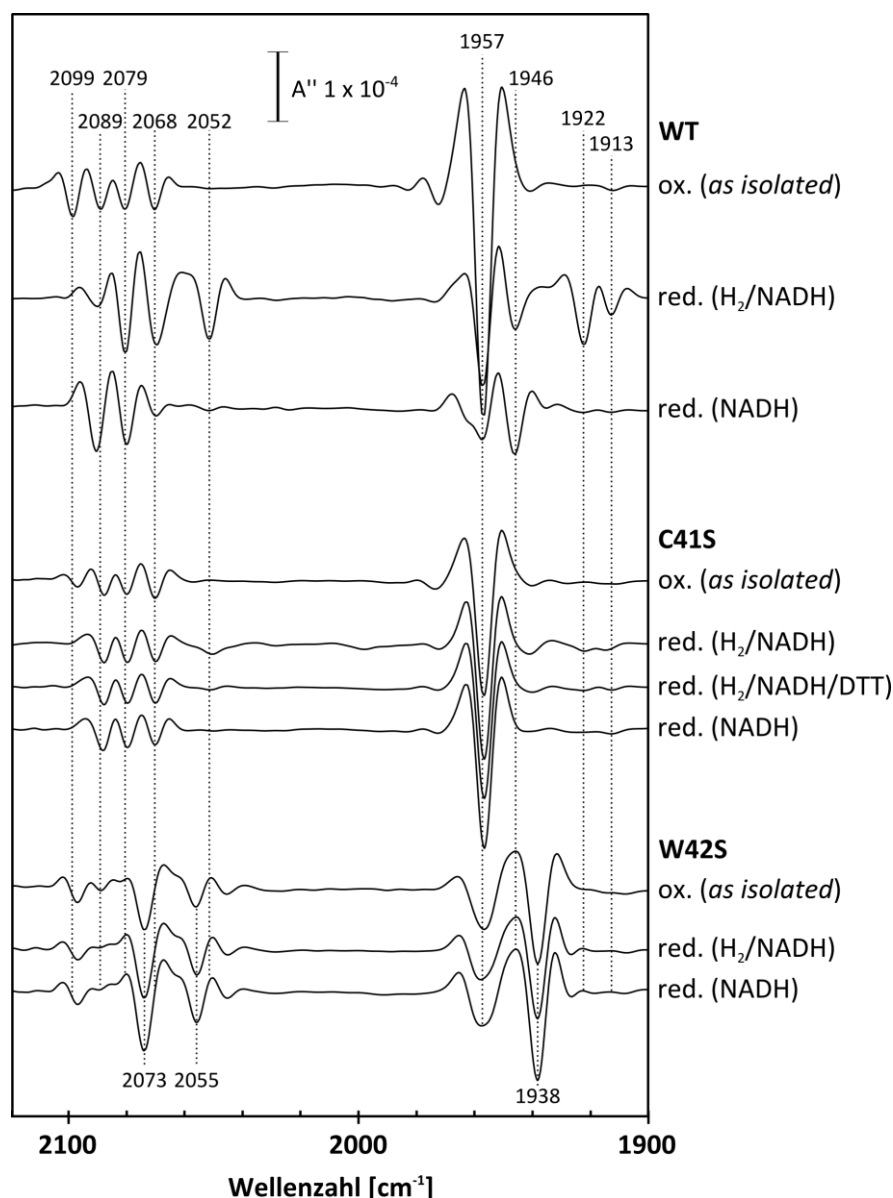


Abb. 38 FTIR-Spektren der SH^{WT}-, SH^{C41S}- und SH^{W42S}-Komplexe. Dargestellt sind die 2. Ableitungen der Spektren der luftoxidierten, unbehandelten (ox. (*as isolated*)) Proben sowie verschieden reduzierter (red.) Proben. Zur Reduktion mit NADH/H₂ wurden 5 mM NADH zur Proteinlösung gegeben und die Proben 30 min unter einer H₂-Atmosphäre inkubiert. Die NADH/H₂/DTT-reduzierte SH^{C41S}-Probe enthielt zusätzlich 10 mM DTT. Zur Reduktion mit NADH wurden den Proteinlösungen 10 mM NADH in einer H₂-freien Atmosphäre zugesetzt.

3.3.2.8 Der SH^{W42S}-Komplex zeigt kaum H₂/D⁺-Austausch-Aktivität

Die biochemische Charakterisierung des SH^{W42S}-Komplexes hat gezeigt, dass der W42S-Austausch in HoxY zu einem Verlust der mit dem Hydrogenasemodul assoziierten Aktivitäten führt, während die Aktivität des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls unbeeinflusst bleibt (Tab. 12). Die spektroskopische Analyse deutet darauf hin, dass das aktive [NiFe]-Zentrum des SH^{W42S}-Komplexes Veränderungen unterliegt (3.3.2.7). Hier sollte nun untersucht werden,

ob das [NiFe]-Zentrum dennoch zu einem vom Elektronentransport über den FeS-Cluster in HoxY unabhängigen H_2/D^+ -Isotopenaustausch befähigt ist.

Die mittels *online*-Massenspektrometrie bestimmten H_2 -abhängigen HD- und D_2 -Produktionsaktivitäten des SH^{W42S} -Komplexes lagen drei Größenordnungen unter denen für den SH^{WT} -Komplex bestimmten Aktivitäten (Tab. 12). Ob die Ursache dafür ein irreversibel geschädigtes [NiFe]-Zentrums oder eine Störung des auch für den Wildtyp-Komplex essentiellen Reaktivierungsmechanismus ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es sei jedoch angemerkt, dass der Einsatz von 5 mM Natriumdithionit in dem H_2/D^+ -Austausch-Versuch unabhängig von NADH und einem intakten Elektronentransport in HoxY eine Reaktivierung des katalytischen [NiFe]-Zentrums ermöglichen sollte.

Tab. 12 Eigenschaften des SH^{W42S} -Komplexes im Vergleich mit der Wildtyp-SH.

	SH^{WT}	SH^{W42S}
H_2-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität [$\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{SH}$]	116 ± 17	0.1 ± 0.1
H_2-abhängige BV-Reduktionsaktivität [$\mu\text{mol BV min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{SH}$]	36 ± 1	<i>unterhalb der Detektionsgrenze</i>
NADH-abhängige BV-Reduktionsaktivität [$\mu\text{mol BV min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{SH}$]	42 ± 2	41 ± 1
MV-abhängige H_2-Produktionsaktivität [$\mu\text{mol H}_2 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{SH}$]	11 ± 2	<i>unterhalb der Detektionsgrenze</i>
FMN-Gehalt [$\mu\text{mol FMN } \mu\text{mol}^{-1} \text{SH}$]	1.04 – 1.27	1.09 – 1.35
H_2/D^+-Austausch		
HD-Produktion [$\mu\text{mol HD min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{SH}$]	6.073 ± 0.540	0.006 ± 0.001
D_2 -Produktion [$\mu\text{mol D}_2 \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{SH}$]	8.614 ± 0.799	0.010 ± 0.001

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das aktive [NiFe]-Zentrum des SH^{W42S} -Komplexes nicht in der Lage ist, mit H_2 zu interagieren. Ob der Aminosäureaustausch zu strukturellen Veränderungen in HoxH führt oder ob das Wegfallen von essentiellen Schutz- bzw. Reaktivierungsmechanismen die Ursache für die Inaktivität ist, konnte bislang jedoch nicht geklärt werden.

3.4 Etablierung eines komplementären Modellsystems für lösliche, O₂-tolerante Hydrogenasen

Die lösliche, NAD⁺-reduzierende Hydrogenase des Actinomyceten *Rhodococcus opacus* MR11 (SH_{RoMR11}) gehört wie die SH aus *R. eutropha* H16 (im Folgenden als SH_{ReH16} bezeichnet) zur Untergruppe der aeroben Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser beiden homologen Proteinkomplexe zeigt, dass die Untereinheiten zwischen 79 und 86 % Identität besitzen (C. Grzeszik, 1996). Trotz des hohen Grads an struktureller Ähnlichkeit unterscheiden sich die beiden Proteinkomplexe hinsichtlich ihrer biochemischen Charakteristika und ihrer Stabilität. So lässt sich die SH_{RoMR11} bei alkalischem pH in Abwesenheit von Ni²⁺-Ionen in ihre auch solitär funktionalen Module, d. h. das aus HoxHY bestehende Hydrogenasemodul und das aus HoxFU bestehende NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul, dissoziieren (Schneider *et al.*, 1984b, C. Zaborosch, 1989). Diese Eigenschaft macht sie für mechanistische und spektroskopische Studien besonders interessant und zu einem möglicherweise besser geeigneten Modellsystem als die SH_{ReH16}, deren Hydrogenase- bzw. NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul bislang nur in geringen Mengen aus *hoxFU*- bzw. *hoxYH*-Deletionsstämmen isoliert werden konnte (Lauterbach *et al.*, 2011b, Lauterbach *et al.*, 2011a). Als komplementäres Modellsystem zur SH_{ReH16} sollte hier deshalb der bereits früher untersuchte SH_{RoMR11}-Komplex sowie dessen Module, HoxHY und HoxFU, etabliert werden.

3.4.1 Heterologe Produktion einer *Strep*-Tag II- tragenden Version der SH aus *R. opacus* MR11 in *R. eutropha*

R. opacus produziert den SH_{RoMR11}-Komplex nur unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen, wodurch sich dessen Produktion im homologen System als aufwendig und durch die Verwendung von Knallgas-Gemischen nicht ungefährlich gestaltet. Es wurde deshalb bereits früher damit begonnen, ein heterologes Expressionssystem der SH_{RoMR11} in *R. eutropha* zu etablieren (Porthun *et al.*, 2002). Dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit um einen N-terminalen *Strep*-Tag II an HoxF erweitert, um eine Reinigung der heterolog produzierten SH_{RoMR11} mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Hierzu wurde ein Genabschnitt, der den *Strep*-Tag II und die Aminosäuren D2-I8 des HoxF-Proteins codiert, aus dem „SH-Operon“ von *R. eutropha* (siehe 3.1) an das *hoxF*-Gen von *R. opacus* angefügt (siehe auch 2.4.4). Das dabei entstandene chimäre *strep-hoxF*-Allel codiert das in Abb. 39 dargestellte *Strep*-HoxF_{RoMR11}-Protein.



Abb. 39 Aminosäuresequenzen von HoxF_{RoMR11}, Strep-HoxF_{ReH16} und Strep-HoxF_{RoMR11}. *R. opacus*- und *R. eutropha*-spezifische Aminosäuren sind pink bzw. grün dargestellt. Die Aminosäuren des *Strep*-Peptids (ASWSHPQFEK(GA)) und konservierte Aminosäuren sind schwarz dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt. Die Codons der unterstrichenen Aminosäuren bilden eine XhoI-Restriktionsschnittstelle.

Insgesamt wurden zwei Varianten der die *Strep*-SH_{RoMR11} codierenden Expressionskassette erstellt. Erstere (auf dem Plasmid pDAK94) codiert neben den Strukturproteinen und der Endopeptidase aus *R. opacus* (*strep-hoxFUYHWI'*_{RoMR11}) einen vollständigen Satz an Maturationsfaktoren (*hypA2,B2,F2,C-X*_{ReH16}) und kann in einem megaplasmidfreien Stammhintergrund, z. B. *R. eutropha* HF210, verwendet werden. Das zweite Konstrukt (auf dem Plasmid pDAK93) enthält neben den Strukturgenen der SH_{RoMR11} nur die SH-spezifischen *hyp*-Gene aus *R. eutropha* (*hypA2B2F2*_{ReH16}) und muss in einem Stammhintergrund, der die Produktion der weiteren Maturationsfaktoren sicherstellt, z. B. *R. eutropha* HF424 [*ΔhoxG, ΔhoxFUYHW*'], verwendet werden.

3.4.2 Die *R. opacus* SH befähigt *R. eutropha* zur H₂-vermittelten NAD⁺-Reduktion

Zum Test der Funktionalität der neuen *Strep-SH_{RoMR11}*-codierenden Expressionskassetten wurden die Plasmide pDAK93 und pDAK94 in die SH- und MBH-freien *R. eutropha*-Stämme HF424 bzw. HF210 übertragen. Die neuen Stämme wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu chemolithoautotrophen Wachstum auf H₂ und CO₂ in Gegenwart atmosphärischer Konzentrationen von Sauerstoff getestet (Abb. 40). Bereits die Arbeit von Porthun *et al.*, 2002 hatte gezeigt, dass die heterologe Produktion der SH aus *R. opacus* lithoautotrophes Wachstum von *R. eutropha* ermöglichen kann. Die sonst nur zu heterotrophen Wachstum befähigten Stämme *R. eutropha* HF210 und HF424 waren durch die Einführung der Plasmide pDAK94 bzw. pDAK93 auch in der Lage, chemolithoautotroph zu wachsen (Abb. 40). Dabei zeigte der Stamm HF424(pDAK93) (alle *hyp*-Gene auf dem Megaplasmid) vergleichbares Wachstum zu Derivaten mit Plasmiden, die die SH_{ReH16} codieren. Dagegen zeigt der Stamm HF210(pDAK94) (*hyp*-Gene nur auf dem Plasmid codiert) verringertes Wachstum (Abb. 40).

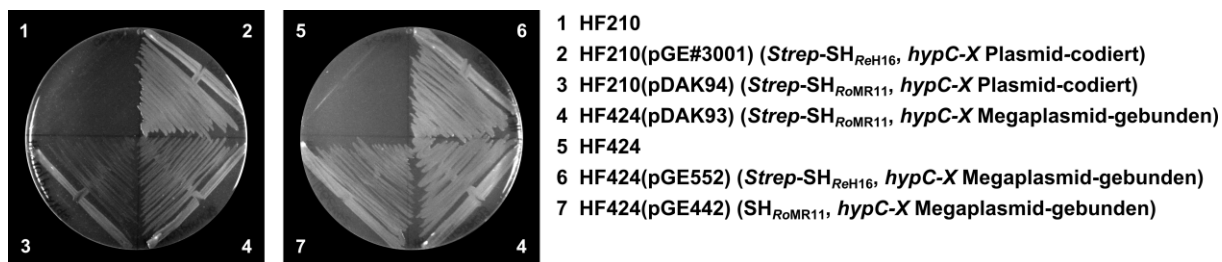


Abb. 40 Chemolithoautotrophes Wachstum SH_{ReH16}- und SH_{RoMR11}-produzierender Stämme. Die angegebenen Stämme wurden auf Mineralagarplatten ausgestrichen und unter einer Atmosphäre aus 3 % (v/v) H₂, 10 % (v/v) CO₂, 20 % (v/v) O₂ und 67 % (v/v) N₂ für 7 Tage bei 30 °C inkubiert.

In den durch Lyse mit CTAB präparierten Rohextrakten der beiden Stämme konnte auch unter Verwendung des bei Schneider *et al.*, 1984b beschriebenen Puffers (50 mM TrisHCl (pH 8,0) mit 5 mM MgCl₂ und 0,5 mM NiCl₂) keine H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität nachgewiesen werden. Da die chemolithoautotrophen Wachstumsversuche jedoch eindeutig die Produktion funktioneller Hydrogenase belegen, sollte im Folgenden ein Protokoll zur Reinigung des aktiven SH_{RoMR11}-Komplexes etabliert werden.

3.4.2.1 Reinigung der heterolog produzierten SH_{RoMR11} über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie

Zur Optimierung des Reinigungsprotokolls wurde der *Strep*-SH_{RoMR11}-Komplex unter verschiedenen Bedingungen mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie aus den beiden zuvor beschriebenen Stämmen (3.4.2) gereinigt. Die unter den getesteten Bedingungen erzielten Ausbeuten sind in Tab. 13 zusammengefasst. Neben den Ausbeuten wurde auch die Qualität der SH_{RoMR11}-Präparationen, d. h. die Reinheit sowie die Untereinheiten-Stöchiometrie des SH-Komplexes, beurteilt (siehe Abb. 41). Zunächst wurden zwei Puffersysteme getestet, in denen die SH_{RoMR11} in früheren Arbeiten Aktivität gezeigt hatte und folglich stabil sein sollte (Tab. 13 Reinigung A + C, Schneider *et al.*, 1984b). Außerdem wurde das für die Reinigung der heterohexameren Form der SH_{ReH16} standardmäßig verwendete Puffersystem 50 mM K-PO₄ (pH 7.1) mit 5 % Glycerin (SH6-Puffer) getestet (Tab. 13 Reinigung B). Dabei zeigte sich, dass sowohl in Bezug auf die Ausbeute als auch in Bezug auf die Homogenität der SH-Präparationen die besten Resultate mit dem SH6-Puffer erzielt wurden (Tab. 13, Abb. 41).

Tab. 13 Übersicht zur Reinigung der *Strep-SH_{RoMR11}* unter verschiedenen Bedingungen.

	Stamm *	Puffersystem	Maßstab [g Zellen **]	Ausbeute [mg Protein g ⁻¹ Zellen **]
A	HF210(pDAK94)	500 mM K-PO ₄ (pH 7,9)	~ 1	~ 0,10
B	HF210(pDAK94)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,15), 5 % Glycerin	~ 1	~ 0,15
C	HF210(pDAK94)	50 mM TrisHCl (pH 8,0), 5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM NiCl ₂	~ 1	~ 0,13
D	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,15), 5 % Glycerin	~ 10	~ 0,19
E	HF210(pDAK94)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,15), 5 % Glycerin	~ 10	~ 0,04
F	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,15), 5 % Glycerin	0,9	~ 0,91
G	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,5), 5 % Glycerin	0,9	~ 1,04
H	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 8,0), 5 % Glycerin	0,9	-
I	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,2), 5 % Glycerin	7,5	~ 0,40
J	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,2), 5 % Glycerin, DNaseI	7,5	~ 0,07
K	HF424(pDAK93)	50 mM K-PO ₄ (pH 7,5), 5 % Glycerin	95	~ 0,40

* HF210(pDAK94): P_{SH(ReH16)}-*strep-hoxFUYHWT*'(RoMR11)*hypA2B2F2hypCDEX*(ReH16) in pHG1⁻-Stamm;
 HF424(pDAK93): P_{SH(ReH16)}-*strep-hoxFUYHW*'(RoMR11)*hypA2B2F2*(ReH16) in pHG1⁺-Stamm mit Δ *hoxG*
 Δ *hoxFUYHW*'

** Nassgewicht

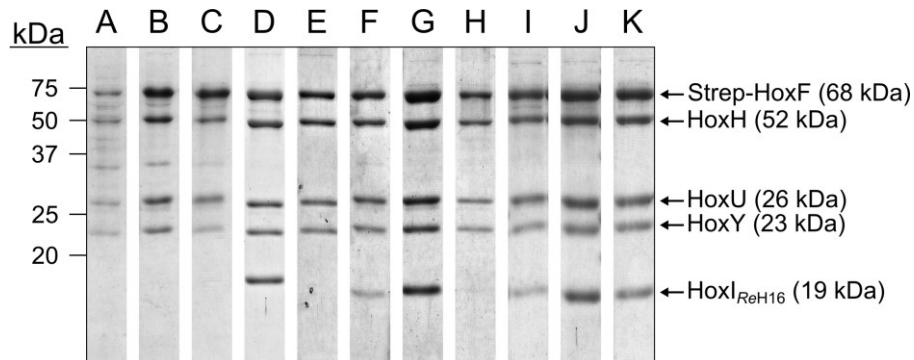


Abb. 41 Über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigte SH_{RoMR11}-Proteine (Reinigung A-K). Je 5 µg Protein der konzentrierten Eluatsfraktionen der Reinigungen A-K (vgl. Tab. 13) wurden in einem 15 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht.

Im Vergleich waren die Proteinmengen, die bei Reinigungen aus dem Stamm HF424(pDAK93) erzielt wurden, etwa 5-mal höher als die der Reinigungen aus dem Stamm HF210(pDAK94) (vgl. Reinigung D und E, F und B in Tab. 13). Dies erklärt auch das verminderte lithoautotrophe Wachstum des letzteren Stamms (vgl. 3.4.2). Allerdings waren die aus dem HF424(pDAK93)-Stamm gereinigten SH_{RoMR11}-Komplexe mit HoxI assoziiert

(Abb. 41), bei dem es sich um das *R. eutropha*-eigene Protein handeln muss. Um Bedingungen zu finden, unter denen der HoxI_{ReH16}-freie SH_{RoMR11}-Komplex in größeren Mengen gereinigt werden kann, wurde der pH-Wert des SH6-Puffers variiert (Tab. 13 Reinigung F-H). Bei pH 8,0 konnte zwar der gewünschte heterotetramere SH_{RoMR11}-Komplex aus dem Stamm HF424(pDAK93) gereinigt werden, die Proteinausbeuten waren unter diesen Bedingungen jedoch deutlich geringer. Dieses System stellte somit keine Verbesserung gegenüber den Bedingungen der Reinigung E dar (Tab. 13). Bei pH 7,5 wurden bessere Proteinausbeuten als bei dem standardmäßig verwendeten pH 7,1 erzielt (Tab. 13). Außerdem enthielt die Waschfraktion dieser Reinigung überproportional viel HoxI_{ReH16}, womit der gereinigte SH_{RoMR11}-Komplex nur noch substöchiometrische Mengen der *R. eutropha* SH-Untereinheit aufweisen sollte. Wie auch bei der SH_{ReH16} führte die Zugabe von DnaseI zum Ausschlusspuffer zu einer deutlich niedrigeren Proteinausbeute (vgl. Tab. 13 Reinigung I und J). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Spuren von Proteaseaktivität der DNaseI (from bovine pancreas - grade II, Roche Diagnostics, Mannheim) sein. Eine solch proteolytische Aktivität wurde schon zuvor im Rahmen der Reinigung der regulatorischen Hydrogenase aus *R. eutropha* beobachtet (T. Buhrke, 2002). Insgesamt zeigte sich, dass die Ausbeuten bei Reinigungen im kleineren Maßstab (~1 g Zellen) höher waren als bei Reinigungen im größeren Maßstab (~10 g Zellen) (siehe Tab. 13 Reinigung B und E, F und D).

Zusammenfassend kann die Reinigung der SH_{RoMR11} aus dem Stamm HF424(pDAK93) unter Verwendung von 50 mM K-PO₄-Puffer (pH 7,2-7,5) mit 5 % (v/w) Glycerin und ohne DnaseI als die beste Wahl für hohe Proteinausbeuten betrachtet werden. Für die Reinigung von SH_{RoMR11} ohne das HoxI_{ReH16}-Protein sollte jedoch auf den Stamm HF210(pDAK94) zurückgegriffen werden, auch wenn sich mit diesem nur deutlich geringere Ausbeuten erzielen lassen.

3.4.2.2 Präparation der solitären HoxFU- und HoxHY-Heterodimere der SH aus *R. opacus*

Die durch Zerfall des heterotetrameren SH_{RoMR11}-Komplexes erhaltenen Module der *R. opacus* SH, HoxHY und HoxFU, hatten sich in früheren Arbeiten in Abwesenheit des jeweils anderen Moduls als stabil und katalytisch aktiv erwiesen (C. Zaborosch, 1989). Um diese interessanten Modellsysteme der Hydrogenase- bzw. NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Aktivität schnell und in größeren Mengen isolieren zu können, sollten hier *R. eutropha*-Stämme etabliert werden, die jeweils nur eines der SH_{RoMR11}-Module produzieren.

In einem ersten Ansatz wurde hierfür auf das relativ kleine Weitwirtsbereichsplasmid pCM62 zurückgegriffen, da sich die resultierenden rekombinanten Expressionsplasmide gut als Ausgangskonstrukte für ortsgerichtete Mutagenesen eignen. Insgesamt wurden drei Stämme mit auf pCM62-basierenden Vektoren, die für das solitäre HoxFU, das solitäre HoxHY bzw. den heterotetrameren SH_{RoMR11}-Komplex codieren, etabliert (siehe auch 2.4.4). Dabei wurde ein *strep-hoxF*-Allel konstruiert, das ein Fusionsprotein aus dem *Strep*-Peptid ((M)ASWSHPQFEK(GA)) und der HoxF_{RoMR11}-Untereinheit codiert. Aus den mikroaerob angezogenen Zellen dieser Stämme sollten die entsprechenden SH_{RoMR11}-Derivate gereinigt werden (vgl. Tab. 14 Reinigung L-N). Für die Reinigung des Hydrogenase- und des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Moduls (Reinigung M bzw. L) wurden hierzu die von Christiane Zaborosch im Rahmen ihrer Doktorarbeit (C. Zaborosch, 1989) hinsichtlich der Stabilität der Heterodimere optimierten Puffer verwendet (siehe Tab. 14). In der Eluatsfraktion der Reinigung L sind eine Vielzahl von Proteinen enthalten, wobei das Coomassie-gefärbte SDS-Gel keine Anreicherung der NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-spezifischen Proteine, *Strep*-HoxF und HoxU, erkennen lässt (Abb. 42). Dennoch konnte im Gegensatz zur Eluatsfraktion der Reinigung M eine NADH:Benzyloxyphenylhydrazin(BV)-Oxidoreduktaseaktivität von 0,2 $\mu\text{mol BV min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein gemessen werden (Tab. 15). Dies entspricht allerdings weniger als 1 % der NADH:BV-Oxidoreduktaseaktivität, die für den in Reinigung N isolierten nativen SH_{RoMR11}-Komplex bestimmt wurde (Tab. 15). Die Präparation des Hydrogenasemoduls (Tab. 14 Reinigung M) enthielt neben den Proteinen HoxH und *Strep*-HoxY nur einige kontaminierende Proteine (Abb. 42) und zeigte eine mit 1,1 Units pro mg Protein deutliche H₂:BV-Oxidoreduktaseaktivität (Tab. 15). Zur Isolation des homogenen HoxHY-Komplexes durch weitere Reinigungsschritte wären jedoch deutlich größere Mengen an Protein notwendig als hier isoliert werden konnten. Der SH_{RoMR11}-Komplex konnte aus dem neu konstruierten Stamm HF424(pDAK111) erfolgreich und in katalytisch aktiver Form gereinigt werden (Tab. 14 Reinigung N, Abb. 42, Tab. 15). Die Ausbeute war jedoch geringer als mit dem unter 3.4.2.1 beschriebenen Produktionsstamm HF424(pDAK93) (siehe Tab. 13).

Tab. 14 Versuche zur Reinigung des HoxHY- und des HoxFU-Moduls der SH_{RoMR11} sowie des heterotetrameren SH_{RoMR11}-Komplexes.

	Stamm	Genotyp	Puffersystem *	Maßstab [g Zellen **]	Ausbeute [mg Protein g ⁻¹ Zellen **]
L	HF210(pDAK109)	[<i>strep-hoxFU</i>] ¹	Dia-Puffer	10	~ 0,04
M	HF424(pDAK110)	[<i>strep-hoxYHW</i>] ¹	Hyd-Puffer	10	~ 0,02
N	HF424(pDAK111)	[<i>strep-hoxFUYHW</i>] ¹	SH6-Puffer	10	~ 0,15
O	HF210(pDAK113o1)	[<i>strep-hoxFU</i>] ²	Dia-Puffer	2	~ 0,02
P	HF210(pDAK113o1)	[<i>strep-hoxFU</i>] ²	SH6-Puffer	2	~ 0,02
Q	HF210(pDAK113o2)	[<i>strep-hoxFU</i>] ²	Dia-Puffer	2	~ 0,04
R	HF210(pDAK113o2)	[<i>strep-hoxFU</i>] ²	SH6-Puffer	2	~ 0,03
S	HF424(pDAK114o1)	[<i>strep-hoxYHW</i>] ²	Hyd-Puffer	2	~ 0,01
T	HF424(pDAK114o1)	[<i>strep-hoxYHW</i>] ²	SH6-Puffer	2	~ 0,02
U	HF1054(pDAK115o1)	[<i>strep-hoxFUYHW</i>] ²	SH6-Puffer	35	~ 0,05
V	HF1054(pDAK115o2)	[<i>strep-hoxFUYHW</i>] ²	SH6-Puffer	35	~ 0,03

¹ auf einem pCM62-Vektor

² auf einem pEDY309-basierten Plasmid

* Dia-Puffer: 50 mM K-PO₄ (pH 7,5) mit 0,5 mM NiCl₂; Hyd-Puffer: 50 mM K-PO₄ (pH 8,5) mit 0,1 mM NiCl₂ (vgl. C. Zaborosch, 1989); SH6-Puffer: 50 mM K-PO₄ (pH 7,1) mit 5 % Glycerin

** Nassgewicht der Zellen

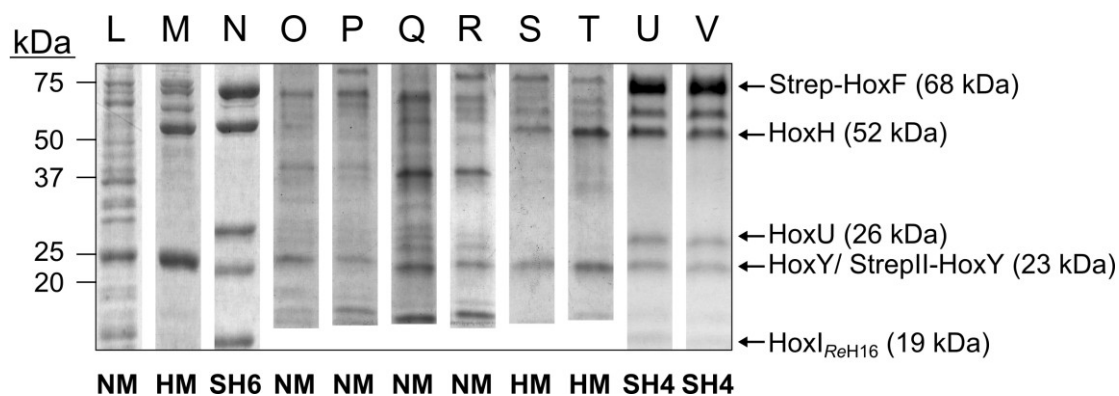


Abb. 42 Über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigte Subformen der SH_{RoMR11} (Reinigung L-V). Der durch den jeweiligen Stamm codierte Proteinkomplex ist angegeben als NM (NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul HoxFU), HM (Hydrogenasemodul HoxHY), SH6 (SH_{RoMR11}-Komplex mit HoxI_{ReH16}) bzw. SH4 (HoxI-freier, heterotetramerer SH_{RoMR11}-Komplex). Je 5 µg Protein der konzentrierten Eluatsfraktionen der Reinigungen L-V (vgl. Tab. 13) wurden in einem 15 %-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht.

Tab. 15 Spezifische Aktivitäten der konzentrierten Eluatsfraktion aus Reinigung L, M und K (vgl. Tab. 14). Die vom SH-Holoenzym, vom Hydrogenasemodul (HoxHY) bzw. vom NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul (HoxFU) katalysierten Aktivitäten - $\text{NAD}^+:\text{H}_2$ -, $\text{H}_2:\text{BV}$ - und $\text{NADH}:\text{BV}$ -Oxidoreduktaseaktivität - wurden photometrisch bestimmt. Ein Unit (1 U) entspricht der Produktion von 1 μmol NADH bzw. BV min^{-1} .

	$\text{NAD}^+, \text{H}_2 \rightarrow \text{NADH}$ [U mg^{-1}]	$\text{H}_2 \rightarrow \text{BV}$ [U mg^{-1}]	$\text{NADH} \rightarrow \text{BV}$ [U mg^{-1}]
Reinigung L (HoxFU)	> 0,1	> 0,1	$0,2 \pm 0,0$
Reinigung M (HoxHY)	> 0,1	$1,1 \pm 0,2$	> 0,1
Reinigung N ($\text{SH}_{\text{RoMR11}}$)	$27,7 \pm 0,2$	$25,3 \pm 6,5$	$121,0 \pm 3,2$

In früheren Arbeiten zur Produktion der MBH konnte gezeigt werden, dass die Plasmidstabilität und folglich auch die erzielbaren Proteinausbeuten bei auf pEDY309 basierenden Expressionssystemen im Vergleich zu pCM62-basierten Expressionssystemen deutlich höher sind (J. Newie, 2010). Es wurde hier deshalb versucht, die Produktion der SH-Derivate aus *R. opacus* durch Umsetzen der entsprechenden Expressionskassetten in den pEDY309-Vektor zu steigern. Dazu wurden Stämme mit beiden möglichen Orientierungen der Expressionskassetten etabliert und Reinigungen mit den Dimer-stabilisierenden Puffern sowie mit dem SH6-Puffer durchgeführt (vgl. Tab. 14). Es konnte hier jedoch keine Verbesserung hinsichtlich Reinheit oder Proteinmenge erreicht werden (Tab. 14, Abb. 42). Zum Test der *strep-hoxFUYHW*-Expressionskassette in einem pEDY309-Rückgrat wurde der *hoxI*-freie *R. eutropha*-Stamm HF1054 verwendet, der im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde. Aus der resultierenden Transkonjugante konnte der $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ -Proteinkomplex in seiner heterotetrameren Form isoliert werden (Abb. 42). Die Proteinausbeute war jedoch im Vergleich zur Reinigung aus dem *hoxI*-haltigen Stamm HF424 geringer (vgl. Reinigung N, Tab. 14).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass sich aus den hier konstruierten Stämmen das HoxFU-Modul der $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ gar nicht und das HoxHY-Modul nur in zu geringen Mengen reinigen ließen. Gleichzeitig sind auch die Proteinausbeuten für das $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ -Protein in den zusätzlich konstruierten Produktionsstämmen geringer im Vergleich zu den unter 3.4.2.1 verwendeten Stämmen. Die Destabilisierung der Transkripte durch fehlende 3'-UTRs ist eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung. Dieses Problem ließe sich durch die Konstruktion neuer Expressionskassetten mit künstlichen Terminatoren überwinden. Für die eingehende Charakterisierung der SH aus *R. opacus* im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Proteinkomplexe verwendet, die mit dem unter 3.4.2.1 beschriebenen Protokoll isoliert wurden.

3.4.3 Vergleichende Untersuchung der löslichen Hydrogenasen aus *R. eutropha* und *R. opacus*

Die H_2 -abhängigen NAD^+ -Reduktionsaktivitäten der wie in 3.4.2.1 beschriebenen gereinigten SH_{RoMR11} -Präparationen schwankte zwischen 6,2 und 31,4 $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein (gemessen in TrisHCl (pH 8,0) mit 5 mM $MgCl_2$, und 0,5 mM $NiCl_2$). Anders als bei der SH aus *R. eutropha* hatte die initiale Oxidation des SH_{RoMR11} -Komplexes mit NAD^+ während des Zellaufschlusses (siehe Reinigungen I-K; vgl. Tab. 13) keinen positiven Effekt auf die Enzymaktivität. Die SH_{RoMR11} -Komplexe aus den Reinigungen I und K (Tab. 13, Abb. 41) mit Aktivitäten von 22,8 bzw. 16,3 $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein wurden für die weitere Charakterisierung eingesetzt.

3.4.3.1 Vergleich der biochemischen Charakteristika

In früheren Arbeiten wurde gefunden, dass die SH_{RoMR11} in dem für Aktivitätsmessung an der SH_{ReH16} standardmäßig verwendeten 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 8,0) keine NAD^+ -Reduktionsaktivität besitzt (Schneider *et al.*, 1984b). Gute Aktivitäten konnten jedoch in einem zusätzlich mit 5 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM $NiCl_2$ versetzten Puffer bestimmt werden (Schneider *et al.*, 1984b). Darauf aufbauend sollte hier untersucht werden, wie sich verschiedene Zusätze, z. B. Flavin-Mononukleotid (FMN) und Dithiothreitol (DTT), auf die Aktivität der SH_{RoMR11} in den beiden Puffersystemen auswirken. Weiterhin sollte ein direkter Vergleich zu den NAD^+ -Reduktionsaktivitäten der SH aus *R. eutropha* unter den verschiedenen Bedingungen erstellt werden.

In einem Puffer bestehend aus lediglich 50 mM TrisHCl (pH 8,0), 5 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM $NiCl_2$ schwankten die Aktivitäten sowohl des SH_{RoMR11} - als auch des SH_{ReH16} -Komplexes je nach Präparation zwischen 12 und 22,8 $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ SH (Tab. S5). Es traten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den SH-Proteinen beider Spezies auf. Zur Analyse der durch die Zusätze hervorgerufenen Aktivitätsänderungen sind im Folgenden die Aktivitäten ausgewählter Präparationen dargestellt (Abb. 43). Eine Zusammenstellung aller erhobenen Messdaten findet sich im Anhang in Tab. S5. Für die SH_{RoMR11} konnte kein positiver Effekt von FMN oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) auf die H_2 -vermittelte NAD^+ -Reduktionsaktivität beobachtet werden (Abb. 43A). Die Zugabe von FMN hatte auch keinen Effekt auf die Aktivität des SH_{ReH16} -Komplexes, sofern das Reduktionsmittel DTT nicht hinzugegeben wurde (siehe auch Kapitel 3.3.1.2). Die Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) zum Ni^{2+} - und Mg^{2+} -haltigen Puffer führte zur Bildung eines braunen

Niederschlags, so dass keine Aktivitätsmessungen unter diesen Bedingungen durchgeführt werden konnten. Interessanterweise konnte unter Verwendung des alternativen Reduktionsmittels TCEP zwar eine deutliche Aktivitätssteigerung der SH aus *R. eutropha* jedoch nicht der aus *R. opacus* beobachtet werden (Abb. 43C). Im 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 8,0) konnte auch unter Verwendung der Zusätzen DTT bzw. FMN, die stabilisierend auf die SH_{ReH16} wirken (vgl. 3.3.1.2), keine Aktivität für den SH_{RoMR11}-Komplex gemessen werden (Abb. 43A).

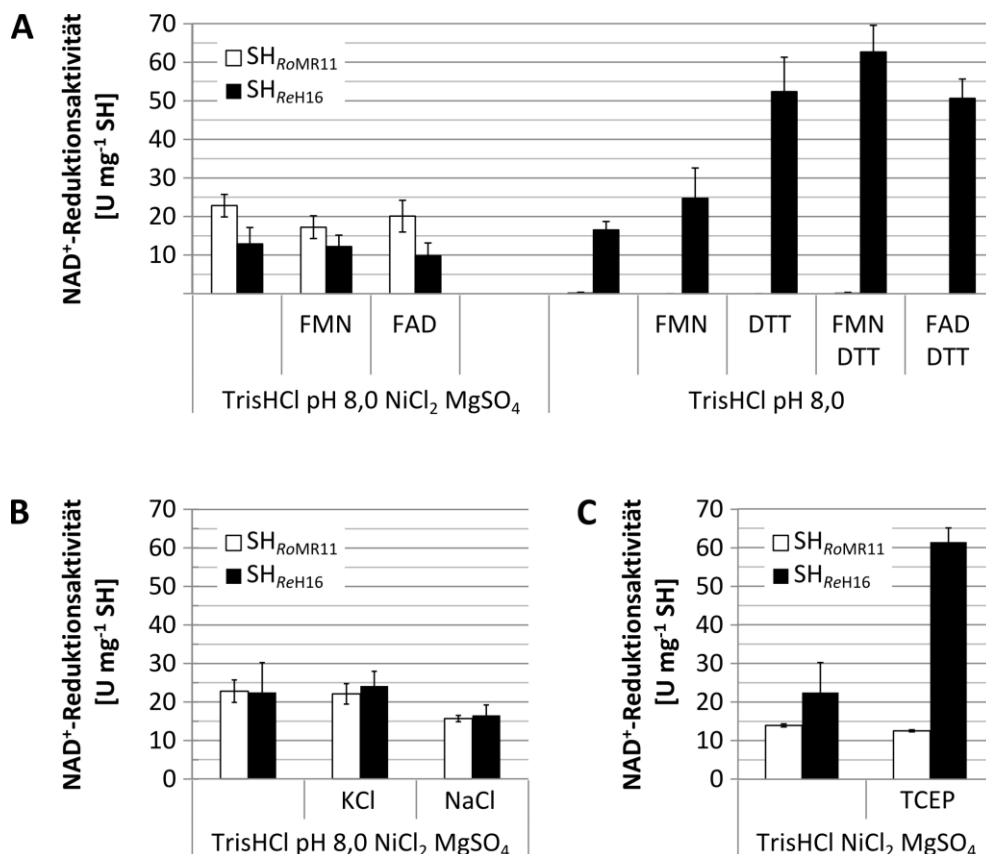


Abb. 43 Direkter Vergleich der H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivitäten der SH_{RoMR11}- und SH_{ReH16}-Komplexe. Ein Unit (1 U) entspricht der Produktion von 1 µmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ Protein. Aktivitäten wurden in 50 mM TrisHCl (pH 8,0) mit 5 mM MgCl₂ und 0,5 mM NiCl₂ und in 50 mM TrisHCl (pH 8,0) unter Zugabe der angegebenen Zusätze in finalen Konzentrationen von 1 µM (FMN/FAD), 1 mM (DTT/TCEP) bzw. 10 mM (KCl/NaCl) bestimmt. Nicht sichtbare Balken entsprechen einer Aktivität von 0 U mg⁻¹ Protein.

Um zu testen, ob die für die SH aus *R. eutropha* beschriebene Empfindlichkeit gegenüber Na⁺-Ionen (3.2.2.3) auch für den SH_{RoMR11}-Komplex zutrifft, wurden die Reaktionsansätze mit 10 mM NaCl bzw. 10 mM KCl als Kontrolle versetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der SH aus *R. opacus* ebenfalls negativ durch Na⁺-Ionen beeinflusst wird (Abb. 43B).

Festzuhalten bleibt, dass sich FMN, FAD und Na^+ -Ionen (in Gegenwart von Ni^{2+} -Ionen) auf die *R. opacus* SH ähnlich auswirken wie auf den SH_{ReH16} -Komplex. Die für den SH_{ReH16} -Komplex charakteristische reduktive Aktivierung konnte für den $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ -Komplexe jedoch weder in An- noch Abwesenheit von Ni^{2+} -Ionen beobachtet werden.

3.4.3.2 Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften

Bereits in früheren Arbeiten sind der SH-Komplex aus *R. opacus* sowie dessen Hydrogenase- und NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Modul mittels EPR-Spektroskopie charakterisiert worden (Schneider *et al.*, 1984a, C. Zaborosch, 1989, Zaborosch *et al.*, 1995). Die dabei detektierten Signale, die den FeS-Clustern zugeordnet wurden, zeigten zum Teil andere Ausprägungen als in den EPR-Spektren der SH aus *R. eutropha* (Schneider *et al.*, 1979, Lauterbach *et al.*, 2011b, Lauterbach *et al.*, 2011a). Ob sich diese Unterschiede auch für den heterolog produzierten und unter gleichen Bedingungen gereinigten $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ -Komplex reproduzieren lassen, sollte hier untersucht werden. Außerdem wurden erstmals die Redoxzustände des aktiven [NiFe]-Zentrums der SH aus *R. opacus* mittels FTIR-Schwingungsspektroskopie untersucht und mit denen des SH_{ReH16} -Komplexes verglichen.

Die in diesem Kapitel gezeigten X-Band-EPR-Spektren sowie die FTIR-Spektren wurden von Dr. Friedhelm Lenzian, Marius Horch und Stefan Wahlefeld am Max-Volmer-Laboratorium der TU Berlin aufgenommen und ausgewertet. Eine weiterführende Diskussion der FTIR-Spektren findet sich auch in der Masterarbeit von Stefan Wahlefeld (S. Wahlefeld, 2013). Die NADH-reduzierte SH_{ReH16} -Probe wurde von Lars Lauterbach präpariert.

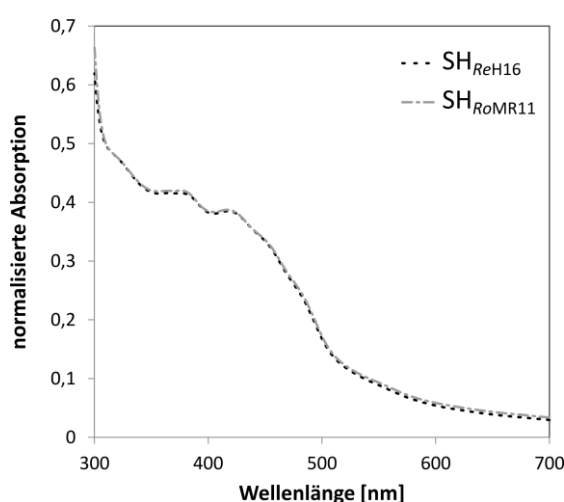


Abb. 44 UV-vis-Absorptionsspektren der SH-Proteine aus *R. eutropha* und *R. opacus* im luftoxidierten Zustand. Die Spektren wurden auf eine Proteinkonzentration von 1 mg ml^{-1} normalisiert.

Ein initialer Vergleich der Absorptionseigenschaften der SH-Proteine aus *R. eutropha* und *R. opacus* im luftoxidierten Zustand mittels UV-vis-Absorptionsspektroskopie zeigte eine perfekte Überlagerung der Absorptionsspektren im für die FeS-Cluster charakteristischen Bereich von 320 bis 500 nm (Abb. 44). In den EPR-Spektren der beiden Enzymkomplexe konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden (Abb. 45). Auffallend ist, dass das für $[3\text{Fe}4\text{S}]^+$ -Cluster spezifische Signal im Spektrum der oxidierten $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ verbreitert ist und einen zusätzlichen Peak bei $g=1.95$ aufweist (Abb. 45). Weiterhin fällt auf, dass in dem bei 10 K aufgenommenen Spektrum der NADH/ H_2 -reduzierten $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ die Intensität der für $[4\text{Fe}4\text{S}]^+$ -Zentren charakteristischen Signale geringer ist als in den äquivalenten Spektren der SH aus *R. eutropha* (Abb. 45). Eine unvollständige Entkopplung der paramagnetischen Zustände des $[2\text{Fe}2\text{S}]^+$ - und des/der $[4\text{Fe}4\text{S}]^+$ -Cluster(s) bei 10 K im Fall der SH aus *R. opacus* wären eine mögliche Erklärung hierfür. Der Umstand, dass die Intensität des Semichinon-Signals bei $g=2.01$ im Spektrum der NADH-reduzierten SH_{ReH16} deutlich erhöht ist, ist der Zugabe von externem FMN geschuldet (Abb. 45). Insgesamt lassen sich den Spektren der beiden SH-Varianten jedoch die gleichen Typen von [FeS]-Zentren zuordnen. Dies sind substöchiometrische Mengen eines $[3\text{Fe}4\text{S}]^+$ -Clusters im oxidierten Zustand, ein $[2\text{Fe}2\text{S}]^+$ -Cluster im reduzierten Zustand bei $T=20/35$ K sowie ein $[2\text{Fe}2\text{S}]^+$ - und ein $[4\text{Fe}4\text{S}]^+$ -Cluster im reduzierten Zustand bei $T=10$ K (Abb. 45). Auch die Signale des aktiven Zentrums, d. h. Ni-B in oxidierten Proben und Ni-C in NADH-reduzierten Proben, treten in den Spektren beider SH-Komplexe mit gleicher Intensität auf (Abb. 45). Aufgrund der Sensitivität der EPR-Spektroskopie gegenüber kleinsten strukturellen und elektromagnetischen Änderungen kann die Ausstattung beider Enzyme mit EPR-aktiven Kofaktoren trotz geringer spektraler Unterschiede als äquivalent betrachtet werden.

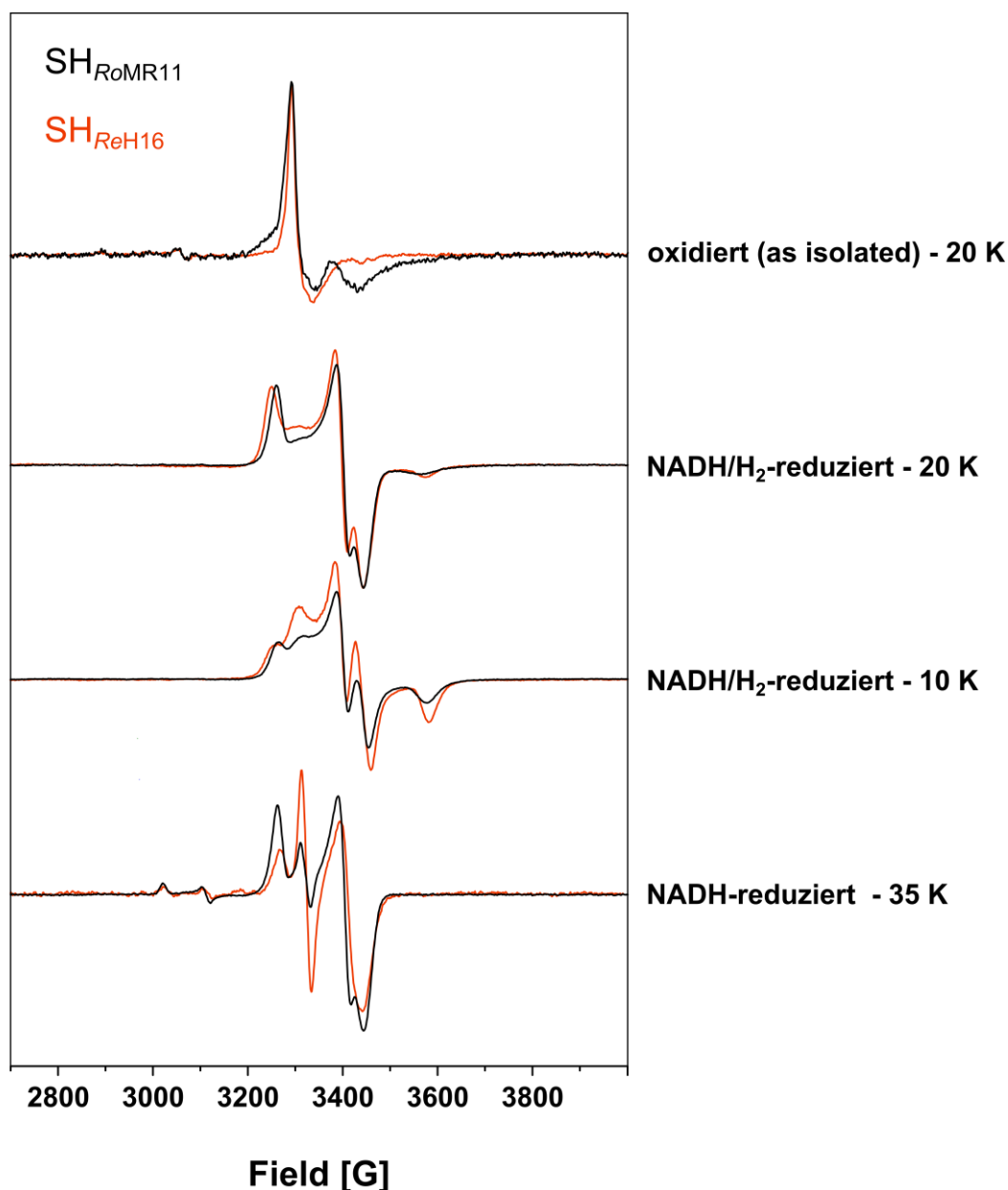


Abb. 45 EPR-Spektroskopie an der SH_{RoMR11} und der SH_{ReH16} . X-Band-Spektren (9,3 GHz) der unbehandelten, luftoxidierten Proben (*as isolated*) wurden bei 20 K aufgezeichnet. Zur Reduktion mit NADH/H₂ wurden 5 mM NADH zur Proteinlösung gegeben und die Proben 30 min unter H₂-Atmosphäre inkubiert. Spektren dieser Proben wurden bei 20 K und 10 K aufgezeichnet. Zur Reduktion mit NADH wurden den Proteinlösungen 10 mM NADH in einer H₂-freien Atmosphäre zugesetzt. Die entsprechenden Spektren wurden bei 35 K aufgezeichnet. Die NADH-reduzierte SH_{ReH16} -Probe enthielt zusätzlich 1 mM FMN. Alle Reduktionen wurden in 50 mM K-PO₄ (pH 7,15) mit 5 % (v/v) Glycerin in Abwesenheit von Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen durchgeführt.

Auch die zur Charakterisierung der Zustände des aktiven [NiFe]-Zentrums aufgenommenen FTIR-Spektren der SH_{RoMR11} -Proben zeigen große Ähnlichkeit zu den entsprechenden Spektren der SH aus *R. eutropha* (Abb. 46). Das Spektrum der luftoxidierten SH_{RoMR11} -Probe lässt, wie beim SH_{ReH16} -Komplex, eine CO-spezifische Bande bei 1958 cm⁻¹ sowie vier CN⁻-

spezifische Banden bei 2098, 2088, 2080 und 2070 cm^{-1} erkennen (Abb. 46). Dieses Spektrum wird als Überlagerung zweier oxidierten [NiFe]-Spezies interpretiert (vgl. 3.3.2.7). Bei den im SH_{RoMR11} -Spektrum zusätzlich auftretenden Banden ($\sim 2170 \text{ cm}^{-1}$ und 2027 cm^{-1}) handelt es sich höchstwahrscheinlich um Artefakte, die durch Wasserdampf bzw. Verunreinigungen im Druckluftstrom hervorgerufen wurden (Stefan Wahlefeld und Marius Horch, persönliche Mitteilung). Im Spektrum der NADH/ H_2 -reduzierten SH_{RoMR11} -Probe waren Schwingungsmodi zu erkennen, die den CN^- - und CO-Liganden in den Ni-SR-, Ni-SR', Ni-SR''- und Ni-SR2-Zuständen zuzuordnen sind. Auffällig im Vergleich zum Spektrum der SH aus *R. eutropha* ist, dass die Intensitäten der Banden, die charakteristisch sind für die Ni-SR- und Ni-SR'/SR''-Zustände, 1946 cm^{-1} sowie 1922, 1913 und 2052 cm^{-1} , deutlich schwächer waren als die der Ni-SR2-spezifischen Banden bei 1956, 2070 und 2080 cm^{-1} . Dies deutet auf einen höheren Anteil von [NiFe]-Zentren im Ni-SR2-Zustand hin, welcher sich durch geringe Unterschiede in den Redoxpotentialen der Kofaktoren in den beiden SH-Proteinen erklären ließe. Möglich ist allerdings auch, dass die letztgenannten Schwingungsmodi nicht dem Ni-SR2-Zustand zugeordnet werden können, da sie möglicherweise eine nichtreduzierbare, oxidierte [NiFe]-Spezies repräsentieren (vgl. Abb. 46, oxidiert (*as isolated*)). Für Letzteres spricht, dass auch das Spektrum des nach Reduktion reoxidierten SH_{RoMR11} -Proteins Banden bei 1956, 2070 und 2080 cm^{-1} zeigte (Daten nicht gezeigt, vgl. S. Wahlefeld, 2013). Das FTIR-Spektrum der NADH-reduzierten SH_{RoMR11} -Probe besitzt wiederum große Ähnlichkeit zu dem der NADH-reduzierten SH aus *R. eutropha* (Abb. 46). Beide Spektren zeigen CO- und CN^- -Streckschwingungen bei 1946, 1956-1960 cm^{-1} sowie 2070, 2080 und 2090 cm^{-1} (Abb. 46), die den katalytisch aktiven Zuständen des [NiFe]-Zentrums, Ni-SR und Ni-C, sowie einem verbleibenden Anteil an oxidierten [NiFe]-Spezies zugeordnet werden können.

Insgesamt zeigen die spektroskopischen Untersuchungen, dass unter den verschiedenen Bedingungen äquivalente Zustände des SH_{RoMR11} - und des SH_{ReH16} -Komplexes detektiert werden können. Ob sich die in der FTIR-Spektroskopie abzeichnenden Unterschiede in der Besetzung der verschiedenen reduzierten Zustände des [NiFe]-Zentrums durch die Reduktionsbedingungen des SH_{RoMR11} -Komplexes, z. B. die Reduktion in Gegenwart von Ni^{2+} -Ionen, modulieren lassen, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

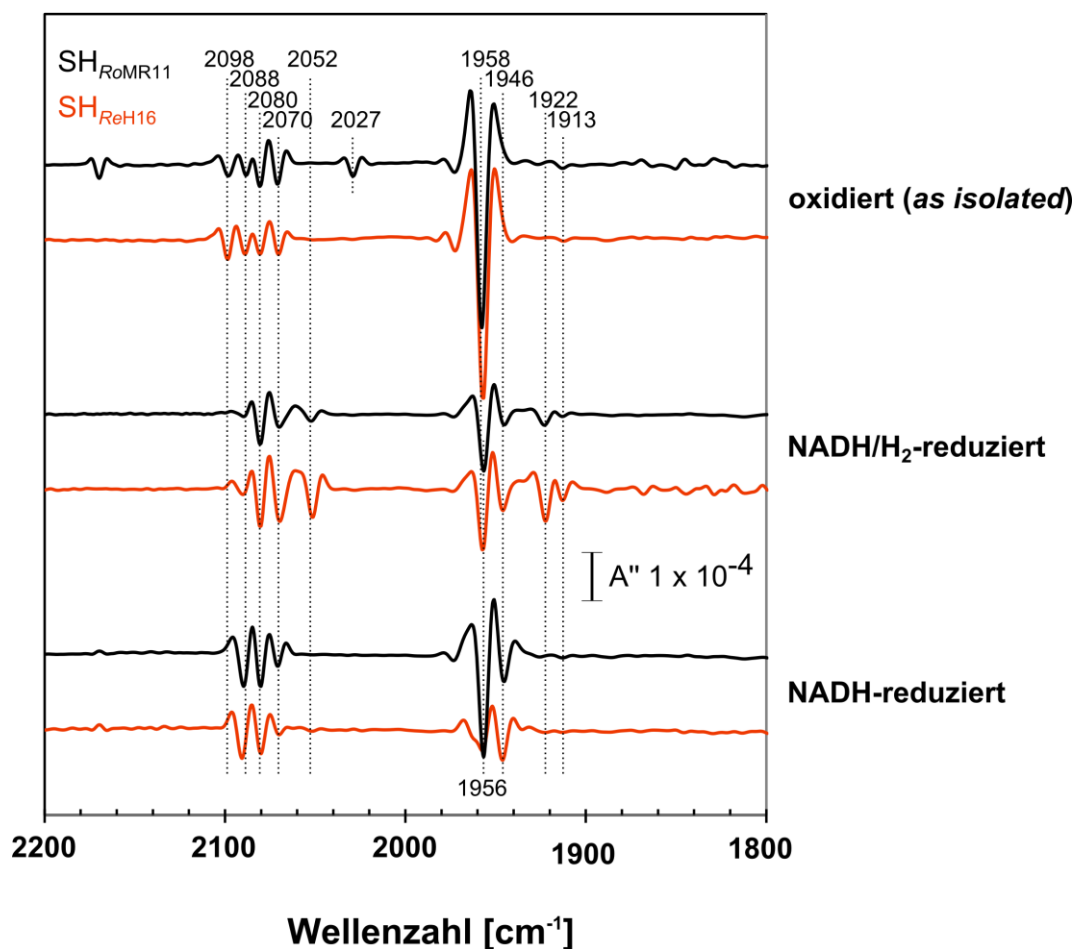


Abb. 46 FTIR-Spektren der $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ und der SH_{ReH16} . Die Spektren (2. Ableitung) der unbehandelten (*as isolated*) und luftoxidierten Proben sowie der in Abwesenheit von Ni^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen mit NADH/ H_2 (5 mM NADH und 30-minutige Inkubation unter H_2 -Atmosphäre) bzw. NADH (10 mM) reduzierten Proben sind gezeigt.

3.4.3.3 Elektrochemische Charakterisierung der SH aus *R. opacus*

Die erste elektrochemische Charakterisierung des heterolog produzierten $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ -Komplexes wurde von Holly Reeve und Jenny Bradley am Department of Chemistry der University of Oxford mit Proben der Präparation K (vgl. 3.4.2.1) durchgeführt. Teile der durchgeführten Experimente sind in der *PartII*-Arbeit von Jenny Bradley (J. Bradley, 2013) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass sich der aktive $\text{SH}_{\text{RoMR11}}$ -Komplex gut auf der Graphitelektrode immobilisieren lässt und mit dieser im elektrisch leitenden Kontakt steht (Abb. 47D). Dies ist eine grundlegende Voraussetzung für die Charakterisierung mittels Proteinfilm-Voltammetrie sowie für biotechnologische Anwendungen von an Graphitpartikeln immobilisierten SH-Derivaten.

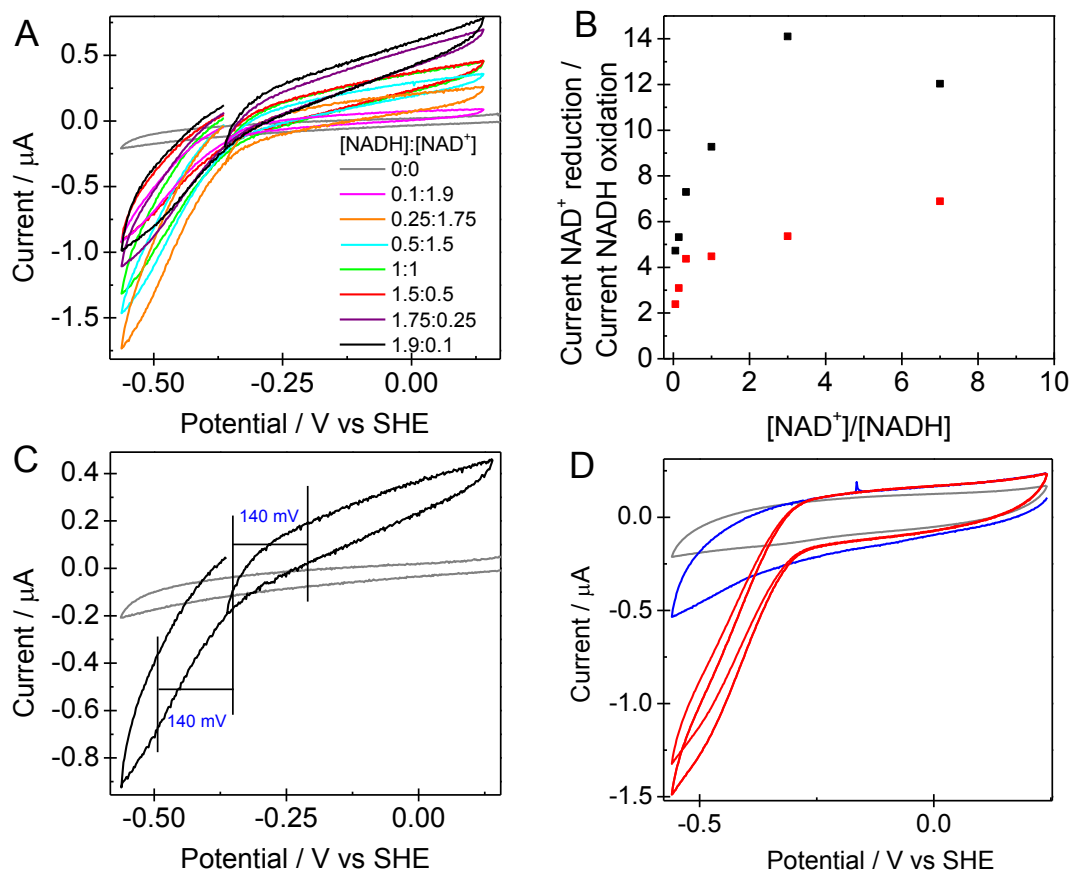


Abb. 47 Bestimmung katalytischer Eigenschaften der SH_{RoMR11} mittels Proteinfilm-Voltammetrie. (A) Zyklische Voltammogramme einer mit heterohexameren SH_{RoMR11}-Komplexen (HoxFUYH_{RoMR11} HoxI_{2,ReH16}) modifizierten Graphitelektrode in Gegenwart verschiedener NADH/NAD⁺-Konzentrationsverhältnisse ($c_{\text{gesamt}}=2 \text{ mM}$). Experimente wurden in 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 8,0) bei 30 °C mit einer bei 2500 rpm rotierenden Elektrode durchgeführt. Die schwarze Linie zeigt das Voltammogramm der unmodifizierten Elektrode. (B) Auftragung des Quotienten der NAD⁺-Reduktions- und NADH-Oxidationsströme (ermittelt aus A) gegen die entsprechenden [NAD⁺]/[NADH]-Verhältnisse (schwarze Punkte), die Werte für das isolierte NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul aus *R. eutropha* sind zum Vergleich dargestellt (rote Punkte, aus Lauterbach *et al.*, 2011a). (C) NAD⁺-Reduktions- und NADH-Oxidationsströme (für B) wurden bei $\pm 140 \text{ mV}$ des experimentell ermittelten Redoxpotentials aus den zyklischen Voltammogrammen abgelesen. (D) In Abwesenheit von NAD⁺ (blaue Linie) bzw. Anwesenheit von 1 mM NAD⁺ (rote Linie) aufgenommene Voltammogramme einer mit dem heterohexameren SH_{RoMR11}-Komplex-modifizierten Graphitelektrode. Die graue Linie zeigt das Voltammogramm einer unmodifizierten Graphitelektrode. Experimente wurden in 50 mM K-PO₄-Puffer (pH 7,0) mit einer bei 2000 rpm rotierenden Elektrode durchgeführt.

Durch Aufzeichnung von zyklischen Voltammogrammen in Gegenwart verschiedener Konzentrationsverhältnisse von NAD⁺ und NADH konnte das als katalytischer Bias bezeichnete Verhältnis der NAD⁺-Reduktions- und NADH-Oxidationsraten bestimmt werden (vgl. Abb. 47A-C). Der katalytische Bias beschreibt die Präferenz eines prinzipiell bidirektional arbeitenden Enzyms für die Hin- bzw. Rückreaktion. Hier zeigte sich, dass die SH aus *R. opacus* wie auch das NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul aus *R. eutropha*

bevorzugt die Reduktion von NAD^+ katalysiert (Abb. 47B). In Abwesenheit von NAD^+ (und NADH) wurde nur ein schwacher katalytischer Strom gemessen (Abb. 47D, vgl. J. Bradley, 2013), der auf eine Reduktion von Protonen durch den immobilisierten SH_{RoMR11} -Komplex schließen lässt.

Weitere Versuche zur elektrochemischen Charakterisierung der SH aus *R. opacus*, z. B. eine K_M -Wert-Bestimmung für NAD^+ und NADH sowie die Ermittlung der Produktinhibition durch NADH sind in J. Bradley, 2013 beschrieben, müssen jedoch noch reproduziert werden.

3.4.4 Auftrennung der SH aus *R. opacus* in ihre Module mittels Anion-Austauschchromatographie

Da die heterologe Produktion des solitären Hydrogenase- bzw. NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls der SH aus *R. opacus* nur zu geringen Proteinausbeuten geführt hatte (siehe 3.4.2.2), sollten die HoxHY- und HoxFU-Heterodimere durch chromatographische Auftrennung des nativen SH_{RoMR11} -Proteins isoliert werden.

Ausgehend von dem zuvor beschriebenen Protokoll zur Fraktionierung des SH_{RoMR11} -Heterotetramers (C. Zaborosch, 1989) wurde hier eine Anionenaustausch-Chromatographie im FPLC-Verfahren durchgeführt (Abb. 48). Das Chromatogramm lässt sechs Peaks mit einer Absorption bei 280 nm erkennen (Abb. 48A). Die Fraktionen der ersten beiden Peaks können als Vorfraktion bezeichnet werden. Sie enthalten ungebundene SH_{RoMR11} -Proteine im Komplex mit HoxI_{ReH16} (Abb. 48B). Nach Erhöhung der KCl-Konzentration von 250 mM auf 320 mM eluierte zunächst das HoxFU-Heterodimer, wobei in diesem Experiment das HoxHY-Heterodimers teilweise miteluiert wurde (Abb. 48B). Auch das HoxI_{ReH16}-Protein konnte in den Fraktionen des Peak 3 detektiert werden (Abb. 48B). Bei einer weiteren Erhöhung der KCl-Konzentration kam es zur vollständigen Elution des HoxHY-Heterodimers. Dabei enthielten die Fraktionen des Peak 5 ausschließlich die Untereinheiten des Hydrogenasemoduls (Abb. 48B). In den Fraktionen von Peak 6 konnte kein Protein detektiert werden (Abb. 48). Da das UV-vis-Absorptionsspektrum dieser Fraktionen ein Maximum bei 245 nm zeigte (Daten nicht gezeigt), könnte es sich hierbei möglicherweise um Nukleinsäuren handeln. Die vereinigten und konzentrierten Fraktionen von Peak 3 und Peak 5 wurden hinsichtlich ihrer Hydrogenase- und NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Aktivitäten untersucht (Tab. 16). Dabei zeigte sich, dass die überwiegend HoxFU-Heterodimere enthaltende Probe aus Peak 3 NADH:BV-Oxidoreduktase-Aktivität in der gleichen Größenordnung wie das native Enzym besaß. Hydrogenase-spezifische Aktivität war nicht nachweisbar (Tab. 16). Die

das HoxHY-Heterodimer enthaltende Probe aus Peak 5 zeigte allerdings nur geringe Hydrogenaseaktivität (Tab. 16). Es ist anzumerken, dass im gezeigten Versuch nicht der zuvor beschriebene Puffer zur Stabilisierung des Hydrogenasedimers aus *R. opacus* verwendet wurde (siehe C. Zaborosch, 1989). Außerdem zeigte die Probe eine schwache NADH:BV-Oxidoreduktaseaktivität (Tab. 16), obwohl keine Verunreinigung durch das HoxFU-Heterodimer im Coomassie-Gel zu erkennen war (Abb. 48).

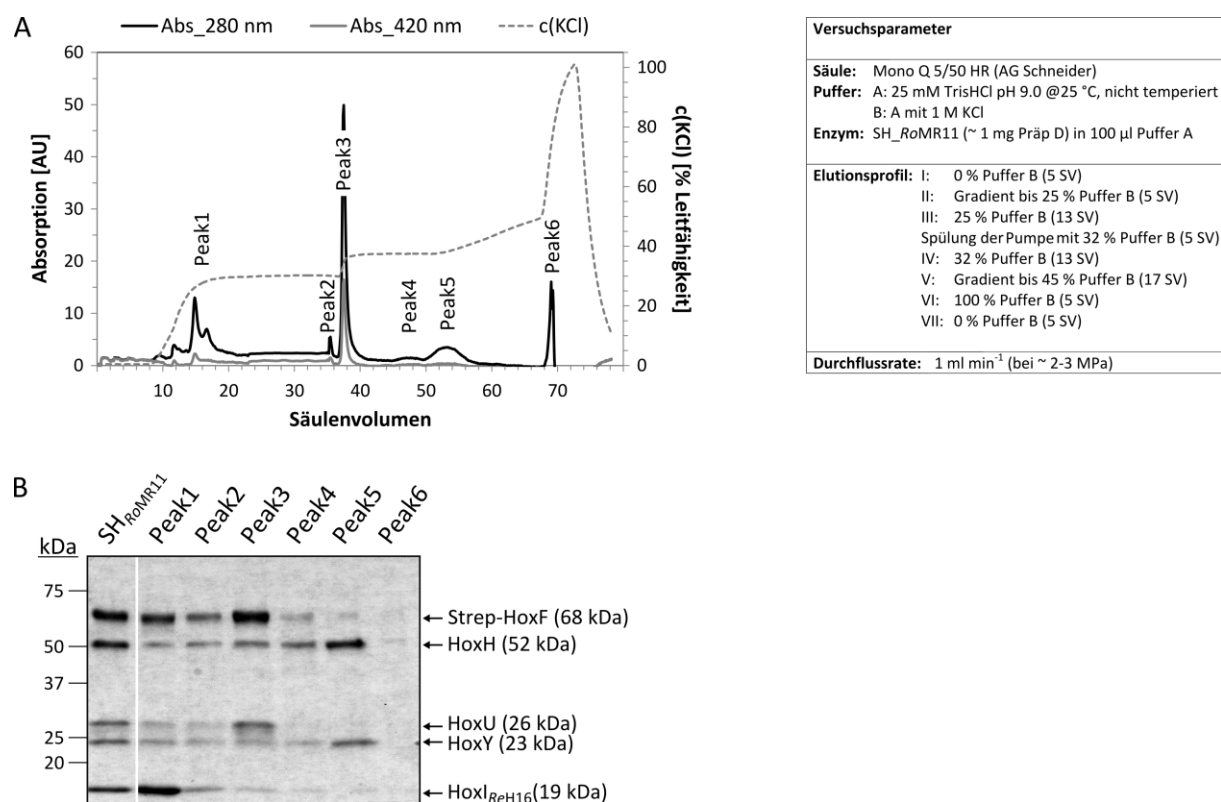


Abb. 48 Trennung des SH_{RoMR11}-Proteins in seine Module mittels Anionenaustausch-Chromatographie. (A) Chromatogramm sowie Versuchsparameter; AU: willkürliche Einheiten, SV: Bettvolumen (1 ml); (B) Die Fraktionen der in (A) markierten Peaks wurden jeweils gepoolt und konzentriert. Proben wurden mittels SDS-PAGE (4-15 %) aufgetrennt und Proteine durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Daten weiterer Versuche finden sich im Anhang unter Abb. S8.

Tab. 16 Spezifische Aktivitäten der nativen SH_{RoMR11} und der durch chromatographische Auftrennung isolierten Module HoxFU und HoxHY. Die NAD⁺:H₂-, H₂:BV- und NADH:BV-Oxidoreduktase-Aktivitäten wurden photometrisch bestimmt. Die vom Hydrogenasemodul katalysierte MV:H⁺-Oxidoreduktaseaktivität wurde gaschromatographisch bestimmt. Ein Unit (1 U) entspricht der Produktion von 1 µmol NADH, BV bzw. H₂ pro min.

	NAD ⁺ , H ₂ → NADH [U mg ⁻¹]	H ₂ → BV [U mg ⁻¹]	MV _{red} → H ₂ [U mg ⁻¹]	NADH → BV [U mg ⁻¹]
SH_{RoMR11}	10,8 ± 1,0	10,1 ± 0,3	3,49	25,9 ± 1,3
HoxFU (Peak 3)	> 0,1	> 0,1	> 0,01	25,9 ± 0,7
HoxHY (Peak 5)	> 0,1	> 0,1	0,03	0,8 ± 0,1

Weitere Versuche mit leichten Variationen der Versuchsparameter wurden durchgeführt, um eine vollständige Trennung der beiden Module des SH_{RoMR11}-Komplexes zu erzielen (siehe Abb. S8). Dabei wurden Bedingungen ermittelt, unter denen sich das HoxFU-Heterodimer weitgehend Hydrogenase-frei isolieren ließ (Abb. S8). Unter diesen Bedingungen enthielten die Fraktionen des HoxHY-Heterodimers jedoch größere Anteile an Proteinen des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls (Abb. S8). Der Versuch, ein Derivat der SH_{ReH16} nach demselben Protokoll zu fraktionieren, resultierte lediglich in einer Abtrennung der HoxI-Untereinheit mit der Vorfraktion (vgl Abb. S7). Die vollständige SH_{ReH16} wurde als Heterotetramer bei einer KCl-Konzentration von 250 mM eluiert (Abb. S7).

Mit dem hier vorgestellten, auf Anionenaustauschchromatographie basierenden Verfahren war es möglich, sowohl das solitäre HoxFU-Modul als auch das HoxHY-Modul der SH aus *R. opacus* zu reinigen. Die dabei isolierten Mengen des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase- bzw. des Hydrogenasemoduls eignen sich gut für die Charakterisierungsansätze mittels Proteinfilm-Voltammetrie.

Diskussion

4.1 Die heterologe Synthese des komplexen SH-Proteins in Cyanobakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur heterologen Produktion der SH aus *R. eutropha* in den cyanobakteriellen Modellorganismen, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *Synechococcus elongatus* PCC 7942 getestet. Hierzu wurden standardisierte Bausteine mit Expressionskassetten für das „SH-Operon“ sowie für Teile des „SH-Operons“ etabliert. Diese Bausteine konnten für die unterschiedlichen Strategien leicht mit anderen Elementen, wie Promotoren, Selektionsmarker und Terminatoren, kombiniert werden. Eine erste Strategie, die einen Austausch der *sacB*-Km^R-Kassette im modifizierten *nrsBAC*-Locus des *Synechocystis*-Stamms SD102 (Liu und Curtiss, 2009) durch die ~6 kb-große Expressionskassette mit *P_{nrsB}-strep-hoxFUYHWI* vorsah, lieferte jedoch keine Transformanten mit dem gewünschten Genotyp. Auch mit einem wesentlich kleineren Kontrollkonstrukt konnte keine gezielte Substitution der *sacB*-Km^R-Kassette erreicht werden. Für zukünftige Studien sollten die homologen Bereiche an den Fragmentenden verlängert werden, um die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Rekombination zu erhöhen. Eine weitere Strategie zielte auf die plasmidbasierte Expression des „SH-Operons“ ab. Anhand eines Modellplasmids, das das fluoreszierende EYFP-Protein codiert, konnte im Rahmen dieses Vorhabens zwar gezeigt werden, dass der *psbAII*_{Syn6803}-Promotor und das verwendete Plasmidrückgrat die heterologe Produktion von Proteinen prinzipiell in allen drei cyanobakteriellen Spezies ermöglichen. Die angestrebte Produktion funktioneller SH aus *R. eutropha* in einem cyanobakteriellen Wirtsorganismus konnte jedoch nicht erreicht werden. Um die Ursachen hierfür genauer zu analysieren und Ansatzpunkte für zukünftige Projekte abzuleiten, ist im Folgenden ein Modell beschrieben, welches die Herausforderungen der heterologen Produktion von Proteinen und Proteinkomplexen skizziert. Das Modell geht von der heterologen Proteinproduktion in einem prokaryotischen Wirt aus. Viele Aspekte des Ansatzes ließen sich jedoch auch auf eukaryotische Wirtssysteme übertragen. Hier soll das Modell auf die heterologe Produktion von in Operonen codierten Multiproteinkomplexen sowie auf die heterologe Proteinproduktion in Cyanobakterien angewendet werden. Aktuelle Beispielarbeiten sollen dabei als Lösungsansätze für verschiedene Problempunkte diskutiert werden. Abschließend sollen Ansätze für zukünftige Strategien zur heterologen Produktion der SH in Cyanobakterien abgeleitet werden.

4.1.1 Herausforderungen der heterologen Synthese komplexer Proteine – ein Modell

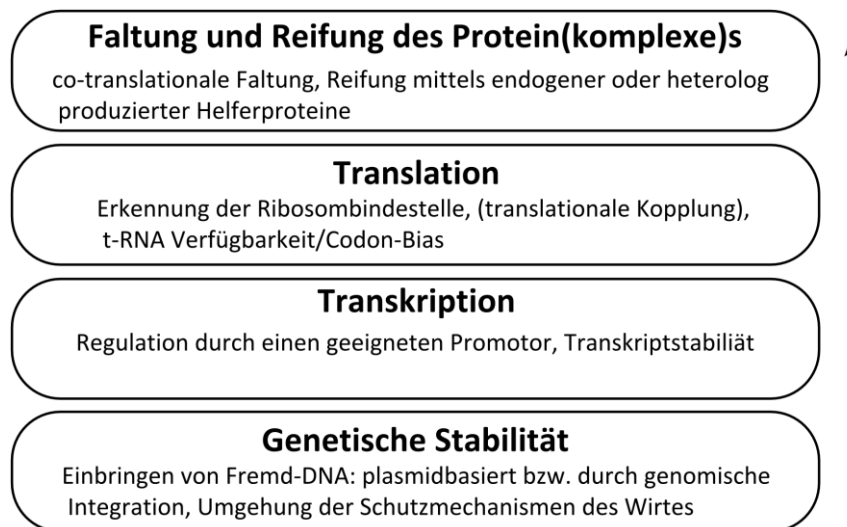


Abb. 49 Modell zu den Herausforderungen der heterologen Produktion von komplexen Proteinen.

Die heterologe Produktion von Proteinen (bzw. Proteinkomplexen) ist eine spezielle Herausforderung, die mehrere Ebenen umfasst (Abb. 49). Zum einen müssen die Fremdgene im Wirtsorganismus stabilisiert werden. Dies geschieht in der Regel über ein essentielles Plasmid, welches z. B. eine Antibiotikaresistenz codiert, oder durch die Integration der Expressionskassette ins Genom des Wirtes. Hierbei muss beachtet werden, dass viele bakterielle Organismen Mechanismen wie z. B. Restriktions-Modifikationssysteme oder CRISPR/Cas-Systeme besitzen, die den Organismus vor fremder DNA schützen (Makarova *et al.*, 2013). In Regel werden deshalb für die heterologe Produktion spezielle Laborstämme verwendet, die sich durch Defekte in diesen Abwehrmechanismen auszeichnen. Hierzu zählen beispielsweise die *hsd*- und *mcr*-Mutanten von *E. coli*. In einer nächsten Ebene muss sichergestellt werden, dass die Fremdgene transkribiert werden. Hierzu ist die Wahl geeigneter, im Wirtsorganismus funktioneller Promotoren von entscheidender Bedeutung. Ein starker, konstitutiver Promotor kann sich jedoch auch nachteilig auswirken, da durch übermäßige Proteinsynthese ein Selektionsdruck für die Entfernung der Expressionskassette geschaffen wird. Es ist deshalb von Vorteil, einen regulierten Promotor zu verwenden, der im Idealfall durch einen nicht toxischen, nicht metabolisierbaren Induktor aktiviert wird. Das beste Beispiel hierfür ist nach wie vor der *lac*-Promotor aus *E. coli* dessen Repression durch das LacI-Protein durch den artifiziellen Induktor Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) aufgehoben wird. Weiterhin muss die Stabilität der mRNA für die Transkription berücksichtigt werden. Um die mRNA vor Abbau zu schützen kann es notwendig sein, stabilisierende Terminatorstrukturen in der 3'-UTR des/der *trans*-Gene(s) zu implementieren.

Eine dritte Ebene der erfolgreichen heterologen Produktion, die jedoch erst relevant wird, wenn die Bildung von stabilen Transkripten sichergestellt ist, umfasst die effiziente Translation. Hierfür sind die Erkennung der Ribosombindestelle (RBS) sowie die Verfügbarkeit der Codon-spezifischen tRNAs entscheidend. Da sowohl die durch die 5'-UTR gesteuerte Initiation der Translation als auch der Codon-Bias einer gewissen Organismus-abhängigen Spezifität unterliegen, sind für die heterologe Produktion gegebenenfalls entsprechende Anpassungen notwendig. Neben der Angleichung der Basensequenz der Expressionskassette, z. B. durch Verwendung von synthetisierter DNA, ist auch die Überexpression seltener tRNAs ein Mittel zur Optimierung der Translationseffizienz, was beispielsweise in den *E. coli* Rosetta-Stämmen (Novagen) Anwendung findet. Als letzte und vierte Ebene der für die heterologe Produktion zu berücksichtigenden Faktoren soll hier die Faltung und Reifung des Protein(komplexe)s definiert werden. Eine zu schnelle Synthese der Aminosäureketten durch das Ribosom kann zu Defiziten bei der Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine bzw. zu Fehlfaltung der Proteine führen. Die Folge hiervon ist die Bildung von *Inclusion bodies* oder der Abbau der fehlgefalteten Proteine durch Proteasen. Die Absenkung der Kultivierungstemperatur ist ein beliebtes Mittel, um die Translationsgeschwindigkeit zu senken und Zeit für eine korrekte Proteinfaltung zu schaffen. Neuere Arbeiten zeigen aber auch, dass seltene Codons den co-translationalen Faltungsprozess natürlicherweise regulieren und somit zum Teil essentielle Funktionen für diese Ebene der heterologen Produktion besitzen (Komar, 2009). Dies muss bei dem Design artifizierlicher Genvarianten Berücksichtigung finden. Neben der korrekten Faltung sind für eine Vielzahl der Proteine weitere Reifungsprozesse notwendig. Dazu gehören beispielsweise die Translokation des Proteins in ein anderes Zellkompartiment, der Einbau von Kofaktoren sowie die Prozessierung der prematuren Proteinformen. Hierbei kann oft auf wirtseigene Systeme, wie z. B. Kofaktor-Synthesewege und die Translokationsmaschinerie, zurückgegriffen werden. Es muss jedoch sichergestellt werden, dass diese unter den verwendeten Bedingungen aktiv und mit dem heterolog produzierten Protein kompatibel sind. Gegebenenfalls müssen wirtseigene oder aus dem Spenderorganismus stammende Maturationsproteine parallel produziert werden, um das funktionelle Zielprotein zu erhalten.

4.1.1.1 Die heterologe Produktion von in Operon-codierten Multiproteinkomplexen

Während die heterologe Produktion einzelner Proteine heute oft routinemäßig in *E. coli* erfolgt, stellt die heterologe Produktion von in Operonen codierten Multiproteinkomplexen oder auch ganzen Biosynthesewegen auch in diesem lang erprobten Wirtssystem häufig eine

Herausforderung dar. Auch wenn es einige Beispiele gibt, in denen ein Operon ohne größere Modifikation erfolgreich in einem Wirtsorganismus exprimiert wird (Lenz *et al.*, 2005, Porthun *et al.*, 2002, Weyman *et al.*, 2011), zeigen andere Beispielarbeiten, dass es zum Teil nur mit erheblichem Aufwand möglich ist, die translationale Regulation des Operons an den Wirtsorganismus anzupassen (Bernstein *et al.*, 2008, Wells *et al.*, 2011, Temme *et al.*, 2012, Schiffels *et al.*, 2013). Ein Ansatz hierbei ist es, das Operon in mehrere Expressionskassetten aufzusplitten (Bernstein *et al.*, 2008, Schiffels *et al.*, 2013). Dies hat den Vorteil, dass die Länge der einzelnen Expressionskassetten verringert wird und damit in vielen Fällen die Stabilität der genetischen Konstrukte sowie der mRNA gesteigert wird. In *E. coli* werden die entsprechenden Expressionskassetten dabei häufig auf mehrere *low-copy* Plasmide verschiedener Kompatibilitätsgruppen verteilt (siehe Sun *et al.*, 2010, Schiffels *et al.*, 2013). Ein alternativer Ansatz zur Optimierung der Translation von in Operon codierten Proteinen ist die Anpassung der intergenischen Bereiche. Das heißt, dass zur Verbesserung der translationalen Kopplung GC-reiche Sequenzen entfernt und wirtsoptimierte RBS eingefügt werden (Bernstein *et al.*, 2008, Wells *et al.*, 2011, Temme *et al.*, 2012, Schiffels *et al.*, 2013). In den meisten Beispielen geht das Design der intergenischen Bereiche einher mit einer Anpassung der Gensequenzen hinsichtlich des GC-Gehalts und Codon-Bias (Bernstein *et al.*, 2008, Wells *et al.*, 2011, Temme *et al.*, 2012). Die positive Wirkung dieser zusätzlichen Maßnahme ist jedoch in der Regel nicht eindeutig gezeigt. Das Beispiel von Schiffels *et al.*, 2013 zeigt, dass allein die Anpassung der intergenischen Bereiche auch bei Verwendung der natürlichen Gensequenzen zur erfolgreichen heterologen Produktion führen kann. Das Einfügen zusätzlicher Promotoren bzw. der Einsatz artifizieller RBS kann im ungünstigen Fall jedoch auch zur Deregulation der natürlichen Konzentrationsverhältnisse der Proteine und Reifungsfaktoren führen. Für die heterologe Produktion der Nitrogenase von *Klebsiella oxytoca* in *E. coli* wurden deshalb in Vorversuchen die optimalen Proteinkonzentration der Untereinheiten bestimmt und entsprechend getrimmte Varianten des T7-Promotors und der RBS in den finalen Konstrukten verwendet (Temme *et al.*, 2012). Bei der heterologen Produktion der SH aus *R. eutropha* in *E. coli* konnte durch Optimierung der Reihenfolge der Strukturproteine im artifiziellen Gencluster eine verbesserte Ausbeute erzielt werden (Schiffels *et al.*, 2013). Leider gibt es (noch) keine allgemeingültige Strategie für die erfolgreiche heterologe Produktion von Multiproteinkomplexen, so dass von Fall zu Fall getestet werden muss, welche der hier vorgestellten Anpassungen zielführend sind.

4.1.1.2 Die heterologe Produktion von Proteinen in Cyanobakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten cyanobakteriellen Spezies zeichnen sich durch ihre natürliche Kompetenz aus. Sie können lineare oder zirkuläre DNA aus ihrer Umgebung aufnehmen und diese über homologe Rekombination in ihre chromosomale DNA oder in endogene Plasmide einbauen, sofern homologe Bereiche vorhanden sind (Lagarde *et al.*, 2000, Clerico *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2011). Während für einen *Knock-out* die vollständige Segregation des dabei entstehenden Allels essentiell ist, reicht es beim *Knock-in* einer Expressionskassette prinzipiell aus, wenn eine der multiplen Kopien des Genoms modifiziert wird. Eine höhere genetische Stabilität wird jedoch erreicht, wenn auch hier eine vollständige Segregation forciert wird. In Vertretern der Gattung *Synechococcus* ist die Integration von Expressionskassetten ins Genom die bevorzugte Vorgehensweise, während in *Synechocystis* auch die plasmidbasierte heterologe Expression Anwendung findet (Kuchmina *et al.*, 2012, Guerrero *et al.*, 2012). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die in *Synechocystis* verwendeten, auf dem RSF1010-Replikon basierten Plasmide in *Synechococcus* PCC 7002 nicht stabil sind und wie für andere Cyanobakterien beschrieben (Elhai *et al.*, 1997), durch Restriktionsendonukleasen abgebaut werden (Xu *et al.*, 2011, M. Ludwig und D. Bryant – persönliche Mitteilung). Es kann jedoch anders als in *Anabaena* sp. PCC 7120 auch durch Methylierung der Plasmide keine Stabilisierung erreicht werden (M. Ludwig und D. Bryant – persönliche Mitteilung, vgl. Elhai *et al.*, 1997). Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Lockau (HU Berlin) wiederum zeigen, dass RSF1010-basierte Plasmide, die zur IncQ-Kompatibilitätsgruppe gehören, durch Konjugation auch in *Synechococcus* übertragen werden können (AG Lockau – persönliche Mitteilung). Ob allein der Vorgang der Konjugation zur Stabilisierung des Plasmids beiträgt oder ob es sich bei dem Isolat der AG Lockau, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, um einen Restriktions-Modifikationssystem-defizienten oder anderweitig modifizierten Unterstamm handelt, ist nicht geklärt. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch bestätigt, dass die plasmidbasierte Expression sowohl in *Synechococcus* sp. PCC 7002 als auch in *S. elongatus* PCC 7942 möglich ist. Bereits frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass der konjugative Plasmidtransfer in einzellige Cyanobakterien besonders bei längeren DNA-Molekülen effizienter ist als die Transformation (Elhai und Wolk, 1988, Marraccini *et al.*, 1993), weshalb diese Form des DNA-Transfers in zukünftigen Arbeiten bevorzugt verwendet werden sollte. Die Zahl der für biotechnologische Anwendungen verwendeten cyanobakteriellen Promotoren ist überschaubar. Aufgrund seiner effizienten Translationsinitiation findet der *psbAIII*-Promotor aus *Synechocystis* häufig Anwendung für die heterologe Proteinproduktion in *Synechocystis* (Liu *et al.*, 2011, Lindberg *et al.*, 2010,

Berto *et al.*, 2011, Germer *et al.*, 2009) und auch in *S. elongatus* (Iwaki *et al.*, 2006). Der *psbAII*-Promotor ist lichtabhängig reguliert und daher unter phototrophen Anzuchtbedingungen quasi konstitutiv. Im Rahmen dieser Arbeit wurde demonstriert, dass dieser Promotor auch in *Synechococcus* funktionell ist, was kürzlich auch Xu *et al.*, 2011 gezeigt haben. Auch wenn für die regulierte Expression verschiedene meist durch Metallionen kontrollierte Promotoren zur Verfügung stehen, z. B. der *nrsB*- und *ziaA*-Promotor aus *Synechocystis* (Liu und Curtiss, 2009, Berto *et al.*, 2011), ist deren Anwendung weniger stark verbreitet. Die Gefahr der Interferenz mit der zellulären Metallhomöostase, eine schwächere Genexpression sowie der Umstand, dass diese Promotoren anders als der *psbAII*-Promotor meist nicht in *E. coli* funktionell sind, sind mögliche Gründe für den zaghafte Einsatz. Der durch den artifiziellen Induktor IPTG kontrollierte *trc*-Promotor, ein künstliches Derivat des *lac*-Promotors aus *E. coli*, ist in *S. elongatus* ebenfalls funktionell und wird dort vielfach eingesetzt (Niederholtmeyer *et al.*, 2010, Ducat *et al.*, 2011a, Weyman *et al.*, 2011). Die Bestrebungen ein solches Promotorsystem auch für *Synechocystis* zu etablieren, waren zunächst daran gescheitert, dass die getesteten *lac*-Promotor-Derivate keine oder eine nicht-reversible Repression durch den LacI-Repressor gezeigt hatten (Huang *et al.*, 2010). Erst kürzlich wurde eine Promotorvariante identifiziert, die auch in *Synechocystis* durch IPTG induzierbar ist (Guerrero *et al.*, 2012). Damit sollte diese zukünftig auch in *Synechocystis* eine regulierte heterologe Genexpression ermöglichen. Auf der Ebene der Translation sind bisher wenige Anpassungen bei der heterologen Produktion in Cyanobakterien beschrieben. In der Regel wurden nur einzelne Gene exprimiert bzw. multiple Expressionskassetten nacheinander in den Wirtsorganismus eingebracht (Liu *et al.*, 2011, Ducat *et al.*, 2011a). Beispiele für die heterologe Expression translational gekoppelter Gene finden sich nur für Operons aus nahe verwandten Stämmen (Germer *et al.*, 2009, Weyman *et al.*, 2011), die ohne Modifikationen übernommen wurden. Es liegen demnach keine belastbaren Informationen für die Anpassungen von Operonstrukturen vor. Für die heterologe Expression pflanzlicher Gene wird in der Regel eine Codon-Optimierung vorgenommen (Liu *et al.*, 2011, Lindberg *et al.*, 2010). Die Notwendigkeit dieser Maßnahme wurde am Beispiel der Biosynthese der Isoprensynthetase aus *Pueraria montana* in *Synechocystis* gezeigt (Lindberg *et al.*, 2010). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, auch wenn sich cyanobakterielle Wirtsorganismen aufgrund ihrer photoautotrophen Lebensweise großer Beliebtheit für biotechnologische Anwendungen erfreuen und die Zahl der Veröffentlichungen, die die heterologe Produktion von Enzymen in Cyanobakterien zeigen, stetig steigt, die im Allgemeinen verwendeten Ansätze sehr einseitig und oft einfach konzipiert sind. Verglichen mit den im Rahmen der synthetischen Biologie für *E. coli* entwickelten Ansätze zur

heterologen Produktion besteht im Bereich der cyanobakteriellen Gentechnik noch ein großes Entwicklungspotential. Ein Ansatzpunkt ist beispielsweise die Etablierung gut charakterisierter, differenziell regulierter Promotoren, ähnlich dem in *E. coli* zur Verfügung stehenden Repertoire an T7-Promotorvarianten (Temme *et al.*, 2012). Dafür wäre es interessant, in Analogie zu dem T7-RNA-Polymerase-basierten Expressionssystem in *E. coli* ein auf einer RNA-Polymerase aus Cyanophagen (Zhu *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2014) aufbauendes Expressionssystem zu entwickeln.

4.1.2 Strategien für zukünftige Arbeiten zur heterologen Produktion der SH

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich keine Vorteile durch die Verwendung von *S. elongatus* PCC 7942 bzw. *Synechococcus* sp. PCC 7002 als Wirte für die heterologe Produktion der SH aus *R. eutropha*. Der Vorteil der Verfügbarkeit eines in *E. coli* funktionellen, mit einem artifiziellen Induktor regulierbaren Promotors, der bislang für die Verwendung von *S. elongatus* sprach, trifft durch Optimierung des *lac*-Promotors durch Guerrero *et al.*, 2012 nun auch auf *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu. In Hinblick auf die Kompatibilität mit den durch unsere Kooperationspartner in *Synechocystis* etablierten Optimierungen der Lichtsammelkomplexe und der photosynthetischen Elektronentransportkette (Rögner, 2013, Kwon *et al.*, 2013, Bernát *et al.*, 2009) sollten sich zukünftige Arbeiten wieder auf *Synechocystis* als Wirtssystem fokussieren.

Ein plasmidbasiertes Expressionssystem ist in *Synechocystis* insofern limitiert, dass nur Plasmide einer Kompatibilitätsgruppe zur Verfügung stehen. Eine Aufteilung des SH-Operons auf mehrere Plasmide ist daher nicht möglich. Langfristig bietet sich deshalb die genomische Integration an, da diese das Einbringen multipler Expressionskassetten erlaubt (vgl. Liu *et al.*, 2011, Ducat *et al.*, 2011a). In der gegenwärtigen Test- und Optimierungsphase lässt sich mit einem plasmidbasierten Expressionssystem jedoch Zeit sparen, da gerade die einen markerfreien Locus generierende, zweistufige homologe Rekombination ins Genom (Lagarde *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2011) sehr zeitintensiv ist. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich ein 23,2 kb-großes Plasmid mittels Konjugation aus *E. coli* in *Synechocystis* übertragen lässt. Eine Analyse, weshalb dieses Plasmid nicht die Produktion funktioneller SH vermittelt, sollte nun stufenweise erfolgen. Von der Funktionalität des verwendeten *psbAII*-Promotors kann ausgegangen werden, da mit einem analogen Konstrukt EYFP in *Synechocystis* produziert werden konnte. Im Hinblick auf die Verminderung des Selektionsdrucks durch die quasi konstitutive Aktivität des *psbAII*-Promotors sollte ein Umstieg auf den nun verfügbaren, regulierbaren *lac*-Promotor (Guerrero *et al.*, 2012) in

Erwägung gezogen werden. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Stabilisierung des 13,8 bp-langen SH-Gentranskripts durch eine Terminatorstruktur. Entsprechende Plasmide sind in dieser Arbeit bereits konstruiert worden und müssen nun noch in *Synechocystis* getestet werden. Sollte diese Maßnahme nicht ausreichen, um die heterologe Produktion der SH zu forcieren, sollte in einem nächsten Schritt die Optimierung der Translation erfolgen. Dazu sollten entweder die intergenischen Bereiche auf die Strukturen des Wirtsorganismus angepasst werden oder zusätzliche Promotoren eingefügt werden. Letzteres vermindert die Notwendigkeit der effizienten translationalen Kopplung. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde mit der Etablierung eines Konstrukts, in dem die *hyp*-Gene unter Kontrolle eines eigenen *psbAII*-Promotor stehen bereits getan. Die entsprechenden Plasmide müssen jedoch ebenfalls noch in *Synechocystis* getestet werden. Sollte dieser zusätzliche Promotor nicht ausreichen, könnte die Translationseffizienz an verschiedenen Positionen im Operon mittels transkriptioneller Fusionen des *eyfp*-Gens mit verkürzten Formen des SH-Operons, z. B. *P_{psbAII}-strep-hoxFU-eyfp*, *P_{psbAII}-strep-hoxFUYH-eyfp*, *P_{psbAII}-strep-hoxFUYHW-eyfp* etc., systematisch getestet werden (vgl. Bernstein *et al.*, 2008) und so die Notwendigkeit für weitere Promotoren bestimmt werden. Alternativ zu zusätzlichen Promotoren könnten auch die intergenischen Bereiche durch *Synechocystis*-eigene Sequenzen substituiert werden, um so die translationale Kopplung zu verbessern. Hierbei könnte mittels der zur Verfügung stehenden Daten aus dem *Deep-Sequencing*-Projekts (Mitschke *et al.*, 2011) eine in *Synechocystis* funktionelle Operonstruktur identifiziert werden. Die entsprechenden intergenischen Bereiche könnten dann auf das SH-Operon übertragen werden. Die Verwendung einer einzigen optimierten artifiziellen intergenischen Sequenz, wie im Beispiel der heterologen Produktion der SH in *E. coli* durch Schiffels *et al.*, 2013, hätte den Nachteil, dass durch diese repetitiven Elemente ungewollte Rekombinationen in *Synechocystis* verursacht werden könnten. Eine systematische Anpassung der intergenischen Bereiche macht jedoch eine künstliche Synthese des optimierten SH-Operons notwendig. In diesem Zuge könnte auch eine Anpassungen des GC-Gehalts (Bernstein *et al.*, 2008; SH-Operon 64 %, *Synechocystis* 47,7 %) und des Codon-Bias (Lindberg *et al.*, 2010) vorgenommen werden.

Ein Aspekt, der unabhängig von der transkriptionellen und translationalen Regulation optimiert werden könnte, ist die Reifung der Hydrogenase. Vorangegangene Studien zur heterologen Produktion von [NiFe]-Hydrogenasen haben gezeigt, dass lediglich die Endopeptidase (codiert durch *hoxW* im Fall der SH aus *R. eutropha*) eine sehr hohe Spezifität für die jeweilige Hydrogenase besitzt. Die Funktionen der generellen Maturationsproteine wurden jedoch häufig durch die endogenen Hyp-Proteine übernommen (Wells *et al.*, 2011,

Sun *et al.*, 2010, Schiffels *et al.*, 2013, Weyman *et al.*, 2011). So zeigten Wells *et al.*, 2011, dass für die Produktion der Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 in *E. coli* die *Synechocystis*-Gene *hoxW* und *hypA* essentiell sind, während das Fehlen der die anderen Maturationsfaktoren codierenden Gene (*hypB*, *hypC*, *hypD*, *hypE* und *hypF*) zwar mit Aktivitätseinbußen verbunden ist, jedoch nicht generell die Produktion funktioneller Hydrogenase verhindert. Schiffels *et al.*, 2013, zeigten, dass für die heterologe Produktion der SH aus *R. eutropha* in *E. coli* *hypX* unter den verwendeten Bedingungen überflüssig ist und dass beispielsweise die Gene *hypA2* und *hypB2* durch alternative *hyp*-Gene substituiert werden können. Zur Reduktion der Zahl der zu transferierenden Gene könnte deshalb eine Studie zur Funktionalität der Hyp-Proteine aus *Synechocystis* (Hoffmann *et al.*, 2006) in der Reifung der SH aus *R. eutropha* durchgeführt werden. Hierfür würden sich Komplementationsstudien in den bestehenden *hyp*-Deletionsstämmen von *R. eutropha* (Dernedde *et al.*, 1996, Wolf *et al.*, 1998) oder in dem von Schiffels *et al.*, 2013 etablierten, auf *E. coli* basierenden System anbieten.

Die erfolgreichen Beispiele für heterolog produzierte [NiFe]-Hydrogenasen (Wells *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2010, Weyman *et al.*, 2011, Schiffels *et al.*, 2013) geben Hoffnung, dass unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte eine heterologe Produktion der SH aus *R. eutropha* in *Synechocystis* zum Erfolg geführt werden kann. Für die dann anstehende genomische Integration der funktionellen SH-Expressionskassette(n) bietet sich der im Rahmen dieser Arbeit etablierte $\Delta hox59a$ -Stamm an, dessen *hoxEF3UY67H*-Locus deletiert und mit einer *sacB*-Spec^R-Kassette ausgestattet ist.

4.2 Charakterisierung der Hybridkomplexe aus Photosystem I und SH

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Techniken zur funktionellen Charakterisierung der PSI-SH-Hybridkomplexe eingesetzt. Zum einen wurde in *In-vitro*-Versuchen untersucht, ob die Hybridkomplexe aus SH- und PSI-Derivaten zur lichtgetriebenen H₂-Produktion befähigt sind. Zum anderen wurde versucht, mittels elektrochemischer Ansätze eine mögliche elektrische Kopplung von PSI und SH in den Hybridkomplexen nachzuweisen. Dazu wurde einerseits das bereits für den MBH^{PsaE}-PSI Δ PsaE-Hybridkomplex erfolgreich eingesetzte SEIRAS-Setup verwendet, in dem der Hybridkomplex schrittweise auf einer mit Ni²⁺-NTA-Linkern funktionalisierten Goldoberfläche aufgebaut wird (Krassen *et al.*, 2009). Andererseits wurde versucht, das von unseren Partnern an der Universität Bochum etablierte Biobatterie-Setup, in dem PSI-Derivate (bzw. SH-PSI-Komplexe) in einem Osmium-Polymer eingebettet

auf eine Elektrode aufgebracht werden (Badura *et al.*, 2011a), für die Charakterisierung von Komplexen aus Hydrogenase und PSI zu nutzen.

In den *In-vitro*-Versuchen konnte trotz Optimierung der Reaktionsbedingungen und des Einsatzes des in anderen Systemen erfolgreich verwendeten, natürlichen Elektronenmediators Cyt *c*₆ (Iwuchukwu *et al.*, 2010, Lubner *et al.*, 2011) keine lichtabhängige Wasserstoffentwicklung gezeigt werden. Auch die Adaptation eines für die Kaskade aus PSI, dem Ferredoxin PetF und der [FeFe]-Hydrogenase HydA1 (alle aus *Chlamydomonas reinhardtii*) entwickelten Protokolls (Winkler *et al.*, 2009) resultierte in dieser Arbeit nicht in einer lichtabhängigen H₂-Produktion. Dies entspricht Beobachtungen, die für die MBH-PSI-Hybridkomplexe in *In-vitro*-Experimenten gemacht wurden (A. Schwarze, 2010). In Lösung hatte auch der im immobilisierten Zustand funktionelle MBH^{PsaE}-PSIΔPsaE-Komplex keine Aktivität gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ausbildung des Komplexes aus PSIΔPsaE und SH^{PsaE} auf funktionalisierten Goldelektroden mittels SEIRA-Spektroskopie verfolgt und somit bestätigt (vgl. A. Schwarze, 2010). Der Photostrom sowie die nach Beleuchtung im Reaktionsansatz akkumulierte H₂-Menge waren für diesen Hybridkomplex jedoch geringer als für die Kontrolle bestehend aus solitärem PSIΔPsaE. Dieses Ergebnis unterscheidet sich deutlich von den für den MBH^{PsaE}-PSIΔPsaE-Hybridkomplex gemachten Beobachtungen. Dieser hatte im Vergleich zu den Kontrollen eine deutliche lichtabhängige H₂-Produktion gezeigt (Krassen *et al.*, 2009). In dem Biobatterie-Setup wurden in der vorliegenden Arbeit vier Kombinationen aus SH- und PSI-Derivaten (1. SH^{PsaD} + PSIΔPsaD, 2. SH^{PsaE} + PSIΔPsaE, 3. SH^{WT} + PSIΔPsaE-WT, 4. SH^{PetF} + PSI-WT) hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur lichtabhängigen H⁺-Reduktion getestet. Die dabei gemessenen Photoströme waren insgesamt sehr gering und lassen keine eindeutige Interpretation zur Funktionalität der Hybridkomplexe zu. Eine Optimierung des für PSI aus *T. elongatus* optimierten Versuchsprotokolls für die PSI-Derivate aus *Synechocystis* scheint hier notwendig zu sein.

In keinem der drei Ansätze konnte eine elektrische Kopplung der SH-Derivaten mit dem PSI gezeigt werden. Auch wenn technische Ursachen nicht gänzlich ausgeschlossen werden können, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass trotz der Ausbildung von stabilen Hybridkomplexen (siehe auch A. Schwarze, 2010), keine Elektronenleitung zwischen dem F_B- bzw. F_A-Eisenschwefel-(FeS)-cluster des PSI und den FeS-Zentren der SH möglich ist. Anders als beim MBH-Komplex ist es im Fall der SH im physiologischen Kontext nicht notwendig, dass Elektronen an die Oberfläche des Enzymkomplexes geleitet werden, um von dort auf Reaktionspartner zu übertragen zu werden. Gerade FeS-Cluster, die einen möglichst effizienten Elektronentransfer innerhalb des SH-Komplexes gewährleisten sollen, sollten

gegenüber äußeren Einflüssen geschützt sein. Damit ist nicht auszuschließen, dass in den existierenden Hybridkomplexen keine elektrische Verbindung zwischen SH und Photosystem hergestellt werden kann. Hinzu kommt, dass für die Planung der SH-Fusionen mit den peripheren Untereinheiten des PSI kein Strukturmodell der Hydrogenase zur Verfügung stand, während für die Planung der MBH-Fusionen zumindest auf ein Homologiemodell zurückgegriffen werden konnte (A. Schwarze, 2010), welches - wie wir heute wissen - hohe Ähnlichkeit zur tatsächlichen MBH-Struktur besitzt (Fritsch *et al.*, 2011b). Aufwendigere Modifikationen der SH-Proteine mit dem Ziel, den HoxY-FeS-Cluster für einen effizienten Elektronentransfer zugänglich zu machen, können erst geplant werden, wenn auch für die SH eine Kristallstruktur bzw. ein zuverlässiges Strukturmodell zur Verfügung steht.

Eine Alternative zur direkten Verbindung der Hydrogenase mit dem PSI stellt die Kopplung über den NADPH-Pool der Zelle dar. So werden durch die Lichtreaktion der Photosynthese Reduktionsäquivalente in Form von NADPH in der Zelle akkumuliert, die für die H₂-Produktion durch die SH nutzbar gemacht werden könnten. Dies erfordert eine Umwandlung der NAD⁺/NADH-Bindestelle im NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-Modul der SH in eine NADP⁺/NADPH-Bindestelle. Durch gezielte Mutagenese der HoxF-Untereinheit konnten kürzlich erste Erfolge bei der Erweiterung der Substrat-Promiskuität des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls der SH erzielt werden (J. Preissler, 2013). Eine Optimierung der entsprechenden SH-Varianten hinsichtlich ihrer NADPH:Akzeptor-Oxidoreduktaseaktivität ist Gegenstand aktueller Forschung. Auch dieses Projekt würde von der Verfügbarkeit zuverlässiger Strukturdaten für die SH profitieren.

4.3 Physiologische Untersuchungen an sauerstofftoleranten, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenasen

Die SH aus *R. eutropha* besitzt im Gegensatz zur cyanobakteriellen Hydrogenase aus *Synechocystis* die Fähigkeit, H₂ in Gegenwart von O₂ zu oxidieren (Schneider und Schlegel, 1981, McIntosh *et al.*, 2011). Aktuelle Arbeiten zeigen, dass die SH bei der Katalyse in Gegenwart von O₂ Wasser produziert, und die Untersuchungen dieses Prozesses deuten darauf hin, dass eine reduktive Detoxifizierung von O₂ unter anderem am aktiven [NiFe]-Zentrum stattfindet (Lauterbach und Lenz, 2013). Welche Funktion in diesem Zusammenhang dem FeS-Cluster in der kleinen Hydrogenaseuntereinheit zukommt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und soll im Folgenden diskutiert werden. Weiterhin wurde durch die Etablierung eines alternativen Modellsystems für aerobe Pyridinnukleotid-abhängige

Hydrogenasen, basierend auf der SH aus *R. opacus* die Grundlage für weiterführende spektroskopische Untersuchungen geschaffen. Der aktuelle Stand der Arbeiten hierzu und Ansätze für zukünftige Projekte sollen im zweiten Teil dieses Kapitels erörtert werden. Abschließend soll diskutiert werden, ob sich die Sauerstofftoleranz auf cyanobakterielle Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen übertragen lässt.

4.3.1 Einfluss der Aminosäureumgebung des HoxY FeS-Clusters auf die Sauerstofftoleranz der SH aus *R. eutropha*

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die essentielle Funktion der kanonischen Cysteinreste C41, C44, C113 und C179 für die Stabilität und Aktivität des SH-Komplexes. Damit wird die Theorie, dass diese hochkonservierten Aminosäureresten an der Koordination des FeS-Clusters im HoxY-Protein beteiligt sind, gestärkt. Eine Sonderstellung nimmt hierbei das Cystein C41 ein. Im Gegensatz zu den anderen in den kanonischen Cysteinen modifizierten SH-Varianten (einschließlich des SH^{C41G}-Komplexes) ist die SH^{C41S}-Variante stabil und zeigt bis zu 10 % der SH^{WT}-Aktivität. Diese Aktivität konnte jedoch nur unter unphysiologischen, reduktiven Bedingungen beobachtet werden, z. B. nach lange Inkubation mit DTT (in H₂:NAD⁺-Oxidoreduktase-Messungen) oder nach Inkubation mit einem Überschuss an NADH unter anaeroben Bedingungen (im Fall der spektroskopisch analysierten Proben). Zudem zeigte sich in Aktivitätstests eine deutliche Abhängigkeit der im Zuge der reduktiven Reaktivierung beobachteten Lag-Phase von der Proteinkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass für die Reaktivierung ein Elektronentransfer zwischen verschiedenen SH-Molekülen notwendig ist, der wahrscheinlich über die Produktion von reduziertem NADH durch aktivierte SH-Moleküle vollzogen wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass aktive SH^{C41S}-Proteine ein FeS-Zentrum in HoxY enthalten. Aufgrund der veränderten Koordination sind dessen Redox Eigenschaften jedoch grundlegend modifiziert, wodurch stark reduktive Bedingungen für die Reaktivierung der entsprechenden SH-Komplexe notwendig werden. Trotz dieser einschneidenden Veränderung bleibt der FeS-Cluster in der HoxY-Untereinheit der SH^{C41S} für die EPR-Spektroskopie unsichtbar. Die Ursache für diesen EPR-inaktiven Zustand, an dem sich auch durch die im Folgenden diskutierten Aminosäureaustausche nichts ändert, ist bislang nicht geklärt (siehe auch Lauterbach *et al.*, 2011b). Es ist jedoch bekannt, dass für das Hydrogenasemodul der nahe verwandten SH aus *R. opacus* [4Fe4S]⁺-Cluster-spezifische Signale detektieren werden können (Schneider *et al.*, 1984a, Zaborosch *et al.*, 1995). Auch aus diesem Grund wurde im letzten Teil dieser Arbeit auf eine Reetablierung des SH_{RoMR11}-Komplexes als komplementäres Modellsystems für aerobe Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen hingearbeitet (siehe 4.3.3). Ein auf die oxidative Schädigung eines

oder mehrerer [4Fe4S]-Cluster der SH hindeutendes Signal, das charakteristisch für [3Fe4S]⁺-Cluster ist, tritt in der Regel in substöchiometrischen Intensitäten auf. Maximal 10 % der aus *R. eutropha* frisch isolierten Wildtyp-SH-Proteine zeigen dieses Signal (Abb. 37; M. Horch und L. Lauterbach – persönliche Kommunikation). Der Anteil dieses Signals in den gereinigten und spektroskopisch untersuchten Proben der SH^{C41S}-Variante war mit 20 % fast doppelt so hoch. Damit wird die Vermutung gestützt, dass die oxidativen Schädigungen womöglich am FeS-Cluster in HoxY auftreten (siehe auch Horch *et al.*, 2012), welcher in Abwesenheit des Cysteinligandes C41 zusätzlich destabilisiert wird.

Durch den systematischen Austausch von Cystein- und Histidinresten im HoxY-Protein sollte untersucht werden, ob es zusätzlich zu den kanonischen Cysteinen weitere Koordinationsstellen des FeS-Cluster in HoxY gibt. In Mutantenstudien an den O₂-toleranten membrangebundenen Hydrogenasen aus *R. eutropha* und *E. coli* hatte ein Austausch der zusätzlichen Cysteinliganden des ungewöhnlichen [4Fe3S]-Clusters eine O₂-Sensitivität der modifizierten MBH-Varianten bewirkt (Goris *et al.*, 2011, Lukey *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass der Cysteinrest C39 Einfluss auf die katalytische Aktivität der SH in Gegenwart (und Abwesenheit) von O₂ besitzt. Die Stämme mit den Aminosäureaustauschen C39G, C39A und C39S zeigten ein durch O₂ inhibiertes chemolithoautotrophes Wachstum. Anders als im Falle des Mutantenstamms, der das MBH^{C19G/C120G}-Protein trägt und der schon bei 10 % (v/v) O₂ stark verlangsamt wächst (Goris *et al.*, 2011), war für die Stämme SH^{C39G} und SH^{C39A} eine Inhibition des Wachstums erst ab 20 % (v/v) O₂ und für den SH^{C39S}-Stamm sogar erst ab 35 % (v/v) O₂ zu verzeichnen. Auch wenn die effektive O₂-Konzentration im Cytoplasma eine andere sein mag als in der periplasmatischen Umgebung der MBH, zeigte sich auch in der *In-vitro*-Charakterisierung der SH^{C39*}-Varianten, dass diese im Vergleich zur wildtypischen SH zwar deutlich auf O₂ reagieren, jedoch auch in Gegenwart von 585 µM (46 %) O₂ ihre Aktivität nicht völlig verlieren. Auffällig ist dabei jedoch, dass die Mutantenproteine im Laufe der Katalyse in Gegenwart von O₂ kontinuierlich inaktiviert werden. Hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden sich die SH^{C39*}-Varianten nicht vom SH^{WT}-Protein. Dies schließt auch die Unzugänglichkeit des HoxY FeS-Clusters für die EPR-Spektroskopie ein (siehe oben). Projiziert man die Aminosäuresequenz von HoxY auf die Kristallstruktur der Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F (Ogata *et al.*, 2005) erscheint die zum Cystein C39 äquivalente Aminosäure Alanin A15 mit 8 Å (zwischen C_β und Fe) zu weit entfernt vom FeS-Zentrum, um an dessen Koordination beteiligt zu sein (Abb. 50). Auffällig ist jedoch, dass das HoxY-Protein aus *R. eutropha* drei Glycinreste in der Proteinschleife

aufweist, die das Cystein C39 und die konservierten Cysteine C41 und C44 beinhaltet. Einer der Glycinreste sitzt dabei zwischen dem C39 und dem C41 (Abb. 28, S. 92). Diese Primärstruktur spricht für eine hohe Flexibilität der entsprechenden Region in der SH, was eine Koordination des FeS-Clusters durch den Cysteinliganden C39 theoretisch ermöglichen könnte. Zum jetzigen Zeitpunkt kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob der C39-Rest den FeS-Cluster koordiniert oder sich lediglich durch Modulation der Proteinumgebung auf dessen Eigenschaften, z. B. das Redoxpotential, auswirkt. Die Tatsache, dass gerade das nächstgelegene hochkonservierte Cystein C41 in der SH entbehrlich scheint (siehe oben), würde in dem Modell einer zusätzlichen Koordination durch das C39 allerdings eine gute Erklärung finden.

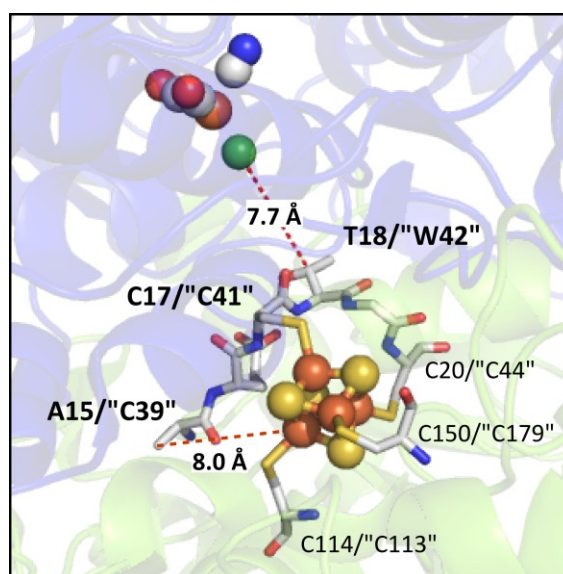


Abb. 50 Ausschnitt der Struktur der Gruppe 1-[NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (pdb:1WUJ). Die große und kleine Untereinheit sind blau bzw. grün dargestellt. Die Atome des aktiven [NiFe]-Zentrums und des proximalen [4Fe4S]-Clusters sind als Kugeln abgebildet. Relevante Aminosäuren sind hervorgehoben und mit Typ und Position in der Hydrogenase aus *D. vulgaris* und den Äquivalenten im HoxY-Protein beschriftet. Die Abstände zwischen dem C β des Threonin T18 und dem Ni des aktiven Zentrums sowie dem C β des Alanin A15 und dem dichtesten Fe des FeS-Clusters wurden mit PyMOL 1.3 bestimmt.

Der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte Aminosäureaustausch W42S führt zu einem vollständigen Verlust aller Hydrogenase-spezifischen Aktivitäten in der entsprechenden SH^{W42S}-Variante. Die Aktivität des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls sowie die Stabilität des Gesamtproteins sind durch diesen Aminosäureaustausch jedoch nicht beeinträchtigt. Außerdem zeigt das FTIR-Spektrum dieser SH-Variante, dass sowohl CN⁻- als auch CO-Liganden im aktiven Zentrum vorhanden sind. Deren Schwingungsmodi konnten jedoch keinem bisher bekannten Zustand des [NiFe]-Zentrums der SH zugeordnet werden und

zeigen keinerlei Veränderung bei reduktiver Behandlung des SH^{W42S}-Komplexes. Da auch unter reduzierenden Bedingungen kein H₂/D⁺-Exchange beobachtet werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass das [NiFe]-Zentrum des SH^{W42S}-Komplexes irreversibel modifiziert ist und nicht mit H₂ interagieren kann. Ob diese Schädigung durch eine sterische Beeinträchtigung des [NiFe]-Zentrum hervorgerufen wird oder auf einen fehlenden Schutzmechanismus vor oxidativen Schädigungen in dieser SH-Variante zurückzuführen ist, kann derzeit nicht gesagt werden. Die Struktur der Hydrogenase aus *D. vulgaris* zeigt, dass die zum W42 in HoxY äquivalente Aminosäure T18 genau zwischen dem [4Fe4S]-Cluster in der kleinen Hydrogenaseuntereinheit und aktivem [NiFe]-Zentrum in der großen Hydrogenaseuntereinheit liegt und von letzterem weniger als 8 Å entfernt ist (Abb. 50). Die Hydroxylgruppe dieses Threonins bildet eine Wasserstoffbrücke zu der Carboxylgruppe des Glutamatrestes E34 in der großen Hydrogenaseuntereinheit aus und trägt somit wahrscheinlich zur Oligomerisierung der Hydrogenaseuntereinheiten bei (Abb. 51).

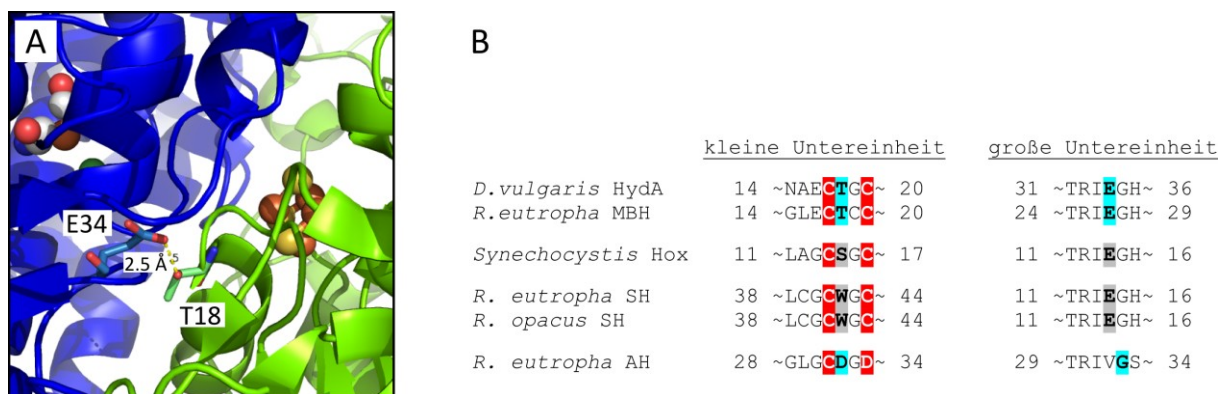


Abb. 51 Interaktion zwischen der kleinen und großen Hydrogenaseuntereinheit. (A) Ausschnitt der Struktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (pdb:1WUJ), der die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Threonin T18 in der kleinen Untereinheit (grün) und dem Glutamat E34 in der großen Untereinheit (blau) zeigt. (B) Der Sequenzvergleich der entsprechenden Motive aus verschiedenen Gruppen von [NiFe]-Hydrogenasen zeigt, dass das Glutamat auch in SH-ähnlichen Hydrogenasen konserviert ist. In der AH aus *R. eutropha* existiert wahrscheinlich eine alternative Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylgruppe des Aspartats D33 in der kleineren Untereinheit und dem Peptidstickstoff des Glycin G33 in der großen Untereinheit (S. Hennig und C. Schäfer - persönliche Kommunikation). Konservierte Cysteinreste, die den (proximalen) FeS-Cluster koordinieren, sind rot hervorgehoben. Bekannte bzw. putative Interaktionspartner sind türkis bzw. grau hinterlegt.

Diese Konfiguration ist in den membrangebundenen Hydrogenasen konserviert und findet sich auch in den cyanobakteriellen Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen mit dem Unterschied, dass dort das Threonin durch ein Serin substituiert ist (Abb. 51, Abb. 28 S. 92). Während die Motive in beiden Hydrogenaseuntereinheiten der Actinobakterien-Hydrogenase

(AH) aus *R. eutropha* Variationen aufweisen wodurch es wahrscheinlich zur Ausbildung einer alternativen Wasserstoffbrückenbindung kommt (S. Hennig und C. Schäfer – persönliche Kommunikation), enthalten die großen Untereinheiten der SH aus *R. eutropha* und verwandter Hydrogenasen ebenfalls das Glutamat-haltige Motiv der Standardhydrogenasen (Abb. 51, Abb. 28 S. 92). Ein Homologiemodell des HoxH-Proteins lässt vermuten, dass auch die entsprechende räumliche Struktur konserviert ist. Der korrespondierende Rest in der kleinen Hydrogenaseuntereinheit ist jedoch das hier diskutierte Tryptophan, welches sich sterisch und chemisch stark von den sonst an dieser Position üblichen Serin- und Threoninresten unterscheidet. Trotz der prägnanten Änderung sind sowohl Stöchiometrie als auch Stabilität des SH^{W42S}-Proteins nicht beeinträchtigt, was einen entscheidenden Einfluss des Restes in der Interaktion zwischen HoxY und HoxH unwahrscheinlich macht. Es sind allerdings andere potentielle Funktionen dieses Aminosäurerestes, die in Zusammenhang mit dem [NiFe]-Zentrum und/oder dem FeS-Cluster stehen könnten, denkbar. Ein Einfluss des Tryptophanrestes auf die Bindung des postulierten FMN-a-Kofaktor in HoxY konnte bereits ausgeschlossen werden (M. Grunzel, 2012). Auch eine stabilisierende Wirkung auf den FeS-Cluster in HoxY scheint unwahrscheinlich, da der Anteil an oxidativ geschädigtem FeS-Cluster in der SH^{W42S}-Variante nicht erhöht war. Ausgehend von dem Modell der reduktiven Reaktivierung des [NiFe]-Zentrums der SH durch rückläufigen Elektronentransport ist eine Beteiligung des Tryptophans an der Weiterleitung von Elektronen und/oder Protonen, die ebenfalls für die Reduktion von O₂ zu H₂O benötigt werden (Lauterbach und Lenz, 2013, Fritsch *et al.*, 2013), ein plausibler Erklärungsansatz für den hier beobachteten Phänotyp der SH^{W42S}-Variante. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass Tryptophane wichtige Funktionen in Elektronen- und Protonentransportprozessen besitzen können und sich auf die Kinetik des Elektronentransports auswirken, wie z. B. in der DNA-Photolyse aus *E. coli* (Sancar, 2003, Shih *et al.*, 2008). Eine Verlangsamung bzw. Unterbrechung des rückläufigen Elektronentransports in Abwesenheit des W42 könnte zu einer irreversiblen Schädigung des [NiFe]-Zentrums im SH^{W42S}-Komplex schon während der Anzucht des entsprechenden Mutantenstamms in Gegenwart von O₂ führen. Die Hydrogenasen in *R. eutropha* werden jedoch nur unter (mikro)aeroben Bedingungen produziert (Cramm, 2009), so dass eine homologe Produktion des SH^{W42S}-Proteins unter anaeroben Bedingungen nicht möglich ist. Eventuell könnte zukünftig auf das seit kurzem verfügbare, effiziente heterologe Produktionssystem der SH in *E. coli* (Schiffels *et al.*, 2013) zurückgegriffen werden, um unter Ausschluss von O₂ produziertes und gereinigtes SH^{W42S}-Protein zu untersuchen. Auch eine Substitution des Tryptophans durch die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin könnte bei der Aufklärung möglicher Elektronen- und Protonentransportprozesse helfen, da diese beiden

Aminosäuren bei ähnlichem sterischen Anspruch Elektronen- und Protonen-leitende bzw. nicht leitende Eigenschaften besitzen. In diesem Zusammenhang scheint es interessant, dass die kleine Hydrogenaseuntereinheit der Hox2-Hydrogenase aus *Thiocapsa roseopersicina* BBS, die dem aeroben Typ der Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen zugeordnet ist, jedoch noch nicht hinsichtlich ihrer Sauerstofftoleranz charakterisiert wurde, einen nicht zur Elektronenweiterleitung befähigten Phenylalaninrest an der entsprechenden Position trägt (vgl. Abb. 28 S. 92).

Zusammenfassend stützen die Ergebnisse der hier an HoxY durchgeführten Mutantenstudie ein Modell, dass die Sauerstofftoleranz der SH in Zusammenhang bringt mit einem effizienten rückläufigen Elektronentransport vom NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul über den FeS-Cluster in HoxY hin zum aktiven [NiFe]-Zentrum.

4.3.2 Einfluss des Verlusts von HoxY auf die Maturation des SH-Komplexes

Aus dem in dieser Arbeit konstruierten SH^{Nqo6}-Stamm konnte interessanterweise trotz Abwesenheit von HoxY ein HoxFUHI₂-Komplex isoliert werden. Dies spricht dafür, dass die Zusammenlagerung des (pre-)HoxH-Proteins mit dem NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul der SH der finalen Assemblierung des Hydrogenasemoduls zeitlich vorausgehen kann. Auch wenn diese Abfolge des Maturationsprozess für die Pyridinnukleotid-abhängige [NiFe]-Hydrogenase aus *Synechocystis* von Wells *et al.*, 2011 bereits vorgeschlagen wurde, lagen bislang keine experimentellen Daten hierzu vor. Ob die HoxH-Untereinheit des in dieser Arbeit isolierte FUHI₂-Komplex ein [NiFe]-Zentrum enthält und bereits durch die Endopeptidase HoxW prozessiert wurde, ist ein Ansatzpunkt für zukünftige Studien zum Maturationsprozess der Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen. Kürzlich wurde von Eckert *et al.*, 2012 gezeigt, dass in einem *hoxY*-Deletionsstamm von *Synechocystis* die prozessierte Form von HoxH produziert wird. Ein Hox(E)FUH-Komplex konnte in diesem Stamm jedoch nicht nachgewiesen werden.

4.3.3 Die SH aus *R. opacus*: Ein alternatives Modellsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein heterologes Produktionssystem für eine Strep-Tag II-tragende Version der SH aus *R. opacus* MR11 in *R. eutropha* etabliert. Nach Optimierung des Reinigungsprotokolls war es möglich bis zu 0,15 mg des (HoxFUYH)_{RoMR11}-Protein und bis zu 1 mg des (HoxFUYH)_{RoMR11}HoxI_{2/ReH16}-Proteins aus einem Gramm heterotroph, unter mikraeroben Bedingungen angezogener Zellen zu isolieren. Durch Verwendung des inzwischen verfügbaren HoxI-freien Stamms *R. eutropha* HF1054 sollte es zukünftig möglich

sein, die Ausbeuten des (HoxFUYH)_{RoMR11}-Proteins noch deutlich zu steigern. Insgesamt liegen die Ausbeuten für die SH_{RoMR11}-Derivate unter denen für die überproduzierte SH_{ReH16}, für welche Ausbeuten von bis 6 mg SH pro Gramm Zellen erzielt wurden (Lauterbach und Lenz, 2013). Dennoch konnten im Rahmen dieser Arbeit ausreichende Mengen an SH_{RoMR11} für spektroskopische Analysen aufgearbeitet werden. Im direkten Vergleich mit dem SH_{ReH16}-Komplex zeigte sich dabei, dass diese beiden homologen Proteine sich sowohl in der EPR- als auch in der FTIR-Spektroskopie sehr ähnlich verhalten. Um die zuvor beschriebene Besonderheit der SH_{RoMR11}, das Vorhandensein eines EPR-aktiven FeS-Clusters im Hydrogenasemodul (Schneider *et al.*, 1984a, Zaborosch *et al.*, 1995), genauer zu untersuchen, wurde hier auch auf die Etablierung eines Protokolls zur Isolation des HoxHY-Dimers der SH_{RoMR11} hingearbeitet. So sollen spektroskopische Studien in einem NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul-freien Hintergrund ermöglicht werden. Da für mechanistische Studien und biotechnologische Anwendungen auch das isolierte NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul von Interesse ist, wurde parallel auch an dessen Produktion gearbeitet. Zum einen wurden Expressionsvektoren konstruiert, die nur die Hydrogenase- bzw. NADH:Akzeptor-Oxidoreduktase-spezifischen Untereinheiten codieren. Diese erwiesen sich jedoch als gering aktiv und müssten zukünftig durch das Einfügen mRNA-stabilisierender Terminatorstrukturen optimiert werden. Außerdem wurde versucht, das auf Anion-Austauschchromatographie basierende Protokoll zur Dissoziation des heterotetrameren SH_{RoMR11}-Komplexes (Zaborosch *et al.*, 1995) auf das heterolog produzierte SH-Protein anzuwenden. Dabei konnte entweder eine Abtrennung des homogenen Hydrogenase- oder des NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls erreicht werden. Eine saubere Dissoziation des Proteinkomplexes in die beiden Module wie bei C. Zaborosch, 1989 beschrieben, bedarf jedoch noch der Optimierung der Versuchsparameter. Für die Etablierung von Aminosäureaustauschen wäre der erstere, auf den kleineren Expressionsplasmiden basierende Ansatz von Vorteil. Da jedoch nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Dissoziation des SH_{RoMR11}-Komplexes bei geringen-Salzkonzentrationen und alkalischem pH-Wert physiologisch ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Module der SH_{RoMR11} *in vivo* ähnlich instabil sind wie die homologen Heterodimere aus *R. eutropha* (Lauterbach *et al.*, 2011a, Lauterbach *et al.*, 2011b). In diesem Fall könnten die Module in größeren Mengen nur mit Hilfe des Dissoziationsansatzes produziert werden. Da sich laut C. Zaborosch, 1989 maximal 2 mg SH_{RoMR11}-Komplex auf der MonoQ HR 5/50-Säule sauber fraktionieren lassen, müssten für spektroskopische Analysen der Heterodimere Proben aus mehreren Ansätzen vereinigt werden. Im Hinblick darauf wäre es sinnvoll, zunächst das Chromatographieverfahren weiter zu optimieren, so dass beide Module idealerweise mit

einem Protokoll in homogener Form isoliert werden können. Dann könnten zeitgleich Proben für das Hydrogenase- und das NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemodul präpariert werden.

Während sich der SH_{RoMR11}-Komplex in den hier durchgeführten spektroskopischen Analysen insgesamt ähnlich zu dem Protein aus *R. eutropha* verhielt, zeigten sich in der vergleichenden biochemischen Charakterisierung deutliche Unterschiede. Neben der zuvor gemachten Beobachtung, dass die SH_{RoMR11} nur in Anwesenheit von Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität besitzt (Schneider *et al.*, 1984b), ist besonders die fehlende reduktive Reaktivierbarkeit des SH_{RoMR11}-Komplexes durch das relativ milde Reduktionsmittel TCEP auffällig. In diesem Kontext scheint es wahrscheinlich, dass die in den FTIR-Spektren der NADH/H₂-reduzierten SH_{RoMR11}-Proben deutlich hervortretenden Banden bei 1956, 2070 und 2080 cm⁻¹ einem nicht reduzierbaren oxidierten Zustand des Proteinkomplexes zugeordnet werden müssen. Da anders als bei der SH_{ReH16} während der Aufarbeitung durch die Oxidation mit NAD⁺ kein Schutz vor der Bildung inaktiver Spezies erzielt werden konnte (L. Lauterbach, 2013), sollte in zukünftigen Experimenten getestet werden, ob eine Oxidation mit NAD⁺ in Gegenwart von Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen Schutz vor der Bildung nicht reduzierbarer Spezies bietet. Möglich ist allerdings auch, dass der beobachtete Zustand prinzipiell einem der beiden reduktiv reaktivierbaren Zustände der oxidierten (*as isolated*) SH aus *R. eutropha* entspricht, jedoch aufgrund einer schlechteren Zugänglichkeit der SH_{RoMR11} für TCEP nicht reaktiviert werden kann.

Neben neuen Ansätzen zur spektroskopischen Untersuchung von aeroben Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen, bietet das hier etablierte Modellsystem der SH aus *R. opacus* auch eine Alternative zu der bislang nicht erfolgreichen Kristallisation der SH aus *R. eutropha*. Unter Umständen lassen sich die für die Kristallisation notwendigen homogenen Zustände in den isolierten Hydrogenase- bzw. NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasedimeren leichter erzielen als in den heterotetrameren bzw. heterohexameren Zuständen der SH. Dass sich die SH_{RoMR11} auch hervorragend für elektrochemische Untersuchungen mittels Proteinfilmvoltammetrie eignet, wurde in dieser Arbeit mit einigen ersten Experimenten demonstriert. Es ergeben sich somit vielfältige Einsatzmöglichkeiten für die SH aus *R. opacus* als Modell für O₂-tolerante Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen. Nicht zuletzt wäre es interessant, die Determinanten für die Unterschiede zwischen dem *R. eutropha*- und dem *R. opacus*-Protein hinsichtlich der Dissoziationseigenschaften und der Ni²⁺-Abhängigkeit aufzudecken. Hierfür würden sich z. B. die Konstruktion und Charakterisierung chimärer SH-Komplexe anbieten.

4.3.4 Ist Sauerstofftoleranz auf cyanobakterielle Pyridinnukleotid-abhängige Hydrogenasen transferierbar?

Wie häufig in der biologischen Forschung beruhen die Kenntnisse zu den Sauerstofftoleranzmechanismen von Hydrogenasen hauptsächlich auf Enzymvarianten die ihre O₂-Toleranz aufgrund von gezielten Aminosäureaustauschen verloren haben (Buhrke *et al.*, 2005, Goris *et al.*, 2011, Lukey *et al.*, 2011, diese Arbeit). Ein ehrgeiziges Ziel, mit dem ein tiefgründiges Verständnis aller für die Sauerstofftoleranz relevanten Details gezeigt werden könnte, ist die Konstruktion einer O₂-toleranten Variante aus einer O₂-sensitiven Hydrogenase. Auch für die biotechnologische Nutzung effizienter, aber O₂-sensitiver Hydrogenasen ist dieser Ansatz interessant. Es wurden deshalb bereits Versuche unternommen, den vermutlichen Gaskanal der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* nach dem Vorbild der O₂-toleranten regulatorischen Hydrogenase (RH) aus *R. eutropha* zu verengen. Dabei konnte jedoch nur eine leichte Verminderung der Sauerstoffsensitivität erzielt werden (Liebgott *et al.*, 2009, Liebgott *et al.*, 2011). Das heißt, selbst bei diesem relativ gut verstandenen Sauerstofftoleranzmechanismus ist eine direkte Umsetzung der Kenntnisse in eine „Bauanleitung“ für ein O₂-tolerantes Enzym schwierig. Dies ist nicht zuletzt der Fall, weil die strukturellen und funktionellen Besonderheiten der RH und ihres Gaskanals wahrscheinlich über die zwei beschriebenen Aminosäuren hinausgehen. Die Aufklärung der Sauerstofftoleranz Pyridinnukleotid-abhängiger Hydrogenasen steht erst am Anfang. Die aktuellen Arbeiten an der SH aus *R. eutropha* zeigen, dass die Fähigkeit zur vollständigen Reduktion von O₂ zu H₂O die Grundlage für den Schutz des Enzyms vor Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies bildet (Lauterbach und Lenz, 2013). Welche strukturellen Besonderheiten diese O₂-Reduktaseaktivität ermöglichen, ist im Detail noch nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Aminosäureumgebung des FeS-Clusters in HoxY durch ihren Einfluss auf die Kinetik des rückläufigen Elektronentransports vom NADH:Akzeptor-Oxidoreduktasemoduls zum aktiven [NiFe]-Zentrum eine wichtige Rolle spielt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Sauerstofftoleranz des Enzyms auf Eigenschaften beruht, die weit über die hier untersuchten Aminosäurereste hinausgehen. Neben der Anpassung der Strukturproteine muss auch die Reifungsmaschinerie auf eine Produktion von Hydrogenasen in Gegenwart von O₂ abgestimmt werden. So zeigen aktuelle Arbeiten zur Maturation der Hydrogenasen aus *R. eutropha*, dass unter aeroben Bedingungen das HypX-Protein essentiell für die Synthese des CO-Liganden im aktiven Zentrum ist (I. Bürstel, 2013). Ein HypX-Homolog ist in Cyanobakterien jedoch nicht codiert und müsste

unter Umständen ebenfalls etabliert werden, wenn es gelingen soll, funktionelle Hydrogenasen in Gegenwart von O_2 in diesen Organismen zu produzieren.

Unabhängig davon welche Modifikationen notwendig sind, um die cyanobakteriellen Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen O_2 -toleranter zu machen, stellt sich die Frage, ob eine auf der katalytischen Detoxifizierung von O_2 basierte Sauerstofftoleranz überhaupt mit einer effizienten Produktion von H_2 vereinbar ist. Sowohl die Reduktion von O_2 als auch die Reduktion von H^+ benötigen Elektronen. Thermodynamisch betrachtet ist dabei die Reduktion von O_2 zu H_2O mit einem Standardredoxpotential von +820 mV vs. SHE (bei pH 7 und 25 °C) günstiger als die Reduktion von H^+ zu H_2 bei -420 mV vs. SHE, so dass erstere Reaktion bevorzugt abläuft. Diese theoretische Überlegung spiegelt sich auch in den Ergebnissen experimenteller Arbeiten an der SH aus *R. eutropha* wider. So wurde kürzlich gezeigt, dass die Rate der NADH-abhängigen H_2 -Produktion in Gegenwart von 509 μM (40 %) O_2 nur ein Fünfzehntel der O_2 -Reduktionsrate beträgt (Lauterbach und Lenz, 2013). Das bedeutet, selbst wenn es gelingen würde, durch gezielte Aminosäureaustausche die auf der katalytischen Umsetzung von O_2 basierende Sauerstofftoleranz auf die cyanobakteriellen Pyridinnukleotid-abhängigen Hydrogenasen zu übertragen, würde dies wahrscheinlich deren Fähigkeit zur H^+ -Reduktion beeinträchtigen. Bislang ist noch nicht vollständig verstanden, wie cyanobakterielle Hydrogenasen mittels der eigentlich zu geringen Reduktionskraft der Pyridinnukleotide (NADH/NAD⁺ bzw. NADPH/NADP⁺), deren Standardredoxpotential bei -320 mV liegt, Protonen reduzieren können. Neben der Theorie, dass eine H_2 -Entwicklung dann auftritt, wenn der NAD(P)H/NAD(P)⁺-Pool stark reduziert ist (Appel *et al.*, 2000, Cournac *et al.*, 2004), wurde kürzlich diskutiert, dass die Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 zusätzlich zu den Pyridinnukleotiden weitere Elektronendonatoren besitzt, beispielsweise Flavodoxine oder Ferredoxine, deren Standardredoxpotential von rund -440 mV weit besser für die H^+ -Reduktion geeignet ist (Gutekunst *et al.*, 2014). Sollte diese Theorie Bestätigung finden, wäre es ein interessanter Ansatz, statt eines Transfers der Sauerstofftoleranz auf die cyanobakteriellen Hydrogenasen eine Steigerung der H_2 -Produktivität der aeroben SH durch eine Erweiterung des Spektrums an Elektronendonatoren nach dem Vorbild der Hydrogenasen aus *Synechocystis* anzustreben. Es würden jedoch auch in solch einer "optimierten" SH-Variante Elektronen bevorzugt auf O_2 übertragen werden und damit für die H_2 -Produktion verloren gehen. Eine effiziente H_2 -Produktion durch die SH scheint nur dann möglich, wenn O_2 nicht als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden kann, was jedoch eine Einschränkung der Sauerstofftoleranz bedeuten würde.

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass ein Sauerstofftoleranzmechanismus, der auf einer katalytischen Entfernung von O_2 basiert, mit der H^+ -Reduktion um Elektronen konkurriert. Das heißt, selbst wenn alle für die Sauerstofftoleranz notwendigen strukturellen Besonderheiten bekannt wären und auf cyanobakterielle Hydrogenasekomplexe übertragen werden könnten, bestünde die Gefahr, dass dies auf Kosten der H_2 -produzierenden Eigenschaften dieser Enzyme geschieht.

4.4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einsatzmöglichkeiten der SH aus *R. eutropha* für die lichtgetriebene H_2 -Produktion in cyanobakteriellen Designzellen untersucht. Ferner wurde an der Aufklärung der Sauerstofftoleranz dieser löslichen, NAD^+ -reduzierenden Hydrogenase gearbeitet.

Basierend auf den Resultaten dieser und anderer parallel angefertigter Arbeiten scheint eine heterologe Produktion der funktionellen SH in einem cyanobakteriellen Wirt möglich. Wie viel Aufwand für die Anpassung des GC-reichen „SH-Operons“ an den cyanobakteriellen Wirt notwendig sein wird, kann hier noch nicht genau abgeschätzt werden und wird sich erst durch die systematische Optimierung der hier etablierten Expressionskassetten zeigen. Das Ziel, die O_2 -tolerante SH in einer cyanobakteriellen Designzelle heterolog zu produzieren, sollte jedoch im Kontext der weiteren Resultate dieser Arbeit kritisch reevaluiert werden. So konnte in den Experimenten zur funktionellen Charakterisierung der Hybridkomplexe aus PSI- und SH-Derivaten kein intermolekularer Elektronentransfer nachgewiesen werden. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Hybridkomplexe in dieser Form nicht für die lichtgetriebene H_2 -Produktion eingesetzt werden können. Eine Planung alternativer Fusionskonstrukte ist besonders dann sinnvoll, wenn die Struktur bzw. ein zuverlässiges Strukturmodell der SH zur Verfügung steht, da zur Durchbrechung der natürlichen Isolation des FeS-Clusters in HoxY (bzw. der FeS-Cluster in HoxU) gegenüber dem Cytoplasma tiefgreifendere Eingriffe in das Protein notwendig zu sein scheinen.

Ausgehend von den aktuellen Erkenntnissen zur Sauerstofftoleranz der SH aus *R. eutropha* stellt sich zudem die Frage, ob dieses Enzym als effizienter H_2 -Produktionskatalysator in Gegenwart von O_2 geeignet ist. So zeichnet sich auch für die SH, wie für die O_2 -toleranten membrangebundenen Hydrogenasen, ein auf der katalytischen Detoxifizierung von O_2 basierender Sauerstofftoleranzmechanismus ab (Fritsch *et al.*, 2013, Lauterbach und Lenz,

2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dabei gezeigt werden, dass die Integrität des FeS-Cluster in HoxY für die katalytische Aktivität des SH-Komplexes wesentlich ist. Auch ein zwischen dem FeS-Cluster und dem [NiFe]-Zentrum in HoxH gelegener Tryptophanrest, der charakteristisch für O₂-tolerante, NAD⁺-reduzierende Hydrogenasen ist, konnte hier als essentiell identifiziert werden. Die Experimente stützen die Hypothese, dass Elektronen über den FeS-Cluster in HoxY (und das Tryptophan W42) zum aktiven [NiFe]-Zentrum transportiert werden müssen, damit eine vollständige Reduktion von O₂ zu H₂O katalysiert werden kann (Lauterbach und Lenz, 2013). In zukünftigen Arbeiten sollte die potentielle Funktion des Tryptophanrestes für die Elektronen- und/oder Protonenweiterleitung zum aktiven Zentrum durch alternative Substitutionen, z. B. durch Tyrosin und Phenylalanin, weiter analysiert werden. Auch das im Rahmen dieser Arbeit reetablierte Modellsystem der SH aus *R. opacus* bietet neue Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten. So sind durch spektroskopische Untersuchungen an den isolierten Modulen neue Einblicke in die Redoxprozesse in O₂-toleranten, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenasen zu erwarten. Weiterhin kann die SH aus *R. opacus* zukünftig auch als Alternative zu der bislang nicht kristallisierbaren SH aus *R. eutropha* für die Aufklärung der Struktur Pyridinnukleotid-abhängiger Hydrogenasen eingesetzt werden. Schon jetzt deutet sich jedoch an, dass die Fähigkeit, das aktive [NiFe]-Zentrum durch schnelle und vollständige Reduktion von O₂ vor Schädigungen zu schützen, und eine hocheffiziente H⁺-Reduktion sich auszuschließen scheinen. Denn beide Prozesse konkurrieren um die verfügbaren Elektronen, wobei die Reduktion von O₂ thermodynamisch günstiger ist (Lauterbach und Lenz, 2013). Das bedeutet, selbst wenn es durch gezielte Modulation der Redox Eigenschaften der FeS-Zentren und des aktiven [NiFe]-Zentrum gelingen würde, O₂-tolerante, NAD⁺-reduzierende Hydrogenasen zu besseren H₂-Produzenten bzw. bidirektionale, cyanobakterielle Hydrogenasen zu O₂-toleranteren Enzymen zu machen, würde diese Modifikation höchstwahrscheinlich auf Kosten der erwünschten intrinsischen Eigenschaft, d. h. der Sauerstofftoleranz bzw. der Bidirektionalität, erfolgen.

Interessanter ist es also vielleicht die SH aus *R. eutropha* als O₂-tolerante, H₂-abhängige NAD⁺-Reduktase zu betrachten, denn auch in dieser, ihrer physiologischen, Reaktionsrichtung besitzt sie ein hohes biotechnologisches Potential. Aktuelle Arbeiten zeigen eindrucksvoll, dass die SH für die H₂-abhängige Kofaktorregenerierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eingesetzt werden kann (S. Hörnig, 2011, Ratzka *et al.*, 2011, Ratzka *et al.*, 2012, Reeve *et al.*, 2012, Lauterbach *et al.*, 2013, L. Lauterbach, T. Lonsdale und B. Nestl – persönliche Kommunikation).

Anhang

Tab. S1 Oligonukleotide. Groß- und Kleinbuchstaben kennzeichnen zum Template komplementäre bzw. nicht komplementäre Bereiche des Primers. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. 5'-Phosphorylierte Oligonukleotide sind entsprechend gekennzeichnet. *Syn* 6803: *Synechocystis* sp. PCC 6803; *Ro* MR11: *Rhodococcus opacus* MR1, fw: forward; rv: reverse

Name	Sequenz (5'→3')	Beschreibung (Restriktionsschnittstelle)	nt
ka1	taa <u>ac</u> ATGTTTAAATTATTCAACCAAGCTAG	fw Primer für <i>petJ</i> (<i>Syn</i> 6803) (PciI)	31
ka2	taa <u>agatct</u> CCAGCCCTTTTCCGCTTGATC	rv Primer für <i>petJ</i> ohne Stop-Codon (<i>Syn</i> 6803) (BglII)	30
ka3	cgg <u>ccatgg</u> CTGACCTAGCCCATGG	fw Primer für <i>petJ</i> ohne <i>leader</i> -Peptid (<i>Syn</i> 6803) (NcoI)	25
ka28	TTC <u>CTGCAGG</u> ATATCGTGGATCC	fw Primer MCS LITMUS28 /rv Primer MCS LITMUS29 (PstI u.w.)	24
ka29	ggtcgacgccatcatttcgatcgcgagcaggcCAGACCGATCGTGG CCACC	rv Primer, bindet <i>upstream</i> des CGCWGCTLSFL-codierenden Bereichs in <i>hoxY</i> + codierende Sequenz (rv) für ACCAIEMMAST-Motiv	52
ka30	gcctgctgcgcgatcgaaatgatggcgtcgaccGACATGGACGAGCG GCTCC	fw Primer, bindet <i>downstream</i> des CGCWGCTLSFL-codierenden Bereichs in <i>hoxY</i> + codierende Sequenz (fw) für ACCAIEMMAST-Motiv	52
ka31	CCAGAGCTC <u>GGCAAAT</u> CGAATGGC	rv Primer in <i>hoxY</i> (SacI)	25
ka36	ATGGTCTCGCGCTTTCCG	fw Primer in <i>hoxU</i>	18
ka37	TTAATCAATCGTAGCGATTG	rv Primer für das 3'-Ende von <i>hoxY</i>	20
ka43	acctaggtgtacaagcttgcggcgctctagaGCCAATTGCAGACGA CTACGGGC	fw Primer für <i>P_{nrsB}</i> (<i>Syn</i> 6803) + MCS (AvrII, BsrGI, HindIII, NotI, XbaI)	55
ka44	tttcgaactgcgggtggtccagctagccatagACCACCTCAAATTG GGAATTTG	rv Primer für <i>P_{nrsB}</i> (<i>Syn</i> 6803)-NdeI- <i>strep-hoxF'</i> (BstBI, NdeI)	56
ka45	P-GTACATCTCGACGGGGGGGAGGGGACGGGGTTA GTAA	fw Linker für 3'-Ende von <i>hoxI</i> (TatI, SpeI - verdaut)	37
ka46	P-ctagTTACTAACCCCGTCCCCTCCCCCGTCGAGA T	rv Linker für 3'-Ende von <i>hoxI</i> (TatI, SpeI - verdaut)	37
ka47	taacatATGCATGAGATGTCGCTGG	fw Primer für <i>hypA2</i> (NdeI)	25
ka48	TAAACCGGTGGCGGACGAGGTCC	rv Primer für <i>hypB2</i> (AgeI)	24
ka49	gaattcgcgccgcttctagagCACATTGCTCCTTTGTGCGTA AC	fw Primer für <i>nrsC</i> (<i>Syn</i> 6803) + MCS (EcoRI, NotI, XbaI) BioBrick Prefix Assembly Standard 10	46
ka50	ctgcagcgccgctactagtAAACTAATGGCTTGGGCTAGGTA TA	rv Primer für <i>nrsC</i> (<i>Syn</i> 6803) + MCS (PstI, NotI, SpeI) BioBrick Suffix Assembly Standard 10	45
ka51	aattctagaGTGTTTACCCATGGAAAAACG	fw Primer für <i>P_{psbAII}</i> (<i>Syn</i> 6803) (XbaI)	31

Anhang

ka52	<u>taacata</u> TGGTTATAATTCCTTATGTATTTGTCTG	rv Primer für P _{psbAII} (<i>Syn</i> 6803) (NdeI)	34
ka55	<u>tctagaaagcttctgcagcgccgcactagttat</u> CAAGATCGTTTCC CC	rv Primer 3'-Ende <i>hypX</i> + MCS (SpeI, NotI, SbfI, HindIII, XbaI)	52
ka56	GGAAGAATTGGTG <u>CAcATGC</u> ATCGGAATTC	fw Mutageneseprimer für NdeI-RS in <i>hypX</i> (kein NdeI)	31
ka57	<u>CAATTGCC</u> GGACCTGTCTG	fw Primer in <i>hypX</i> (MfeI)	18
ka66	TCATTATTTGTAACTGTAAATTGTCC	fw Primer für 3'-Ende von <i>sacB</i>	27
ka67	CCTGCGCGAGCAGGGGAAT <u>gatatc</u> CGATCCTTTTAA CCC	rv Primer für 5'-Ende von <i>sacB</i> – EcoRV- 5'-Ende von <i>aadA</i> (Spec ^R) (EcoRV)	48
ka68	<u>atc</u> CTATTATTTGCCGACTACCTTGG	rv Primer für 3'-Ende von <i>aadA</i> (Spec ^R) (EcoRV-verdaut)	26
ka69	<u>actagt</u> AGGCCGCCCGTTTAGCTGCC	fw Primer für <i>upstream</i> Region von <i>hoxF</i> (<i>Syn</i> 6803) (SpeI)	26
ka70	<u>cgtacg</u> GTAAACAAAAAACATTCAGACGG	rv Primer für <i>upstream</i> Region von <i>hoxF</i> (<i>Syn</i> 6803) (BsiWI)	29
ka71	<u>tctaga</u> GGAAAAATCCTCAAAAAGGAGC	fw Primer für <i>downstream</i> Region von <i>hoxE</i> (<i>Syn</i> 6803) (XbaI)	28
ka72	<u>gagctc</u> GGGGGAACATCTCCCATTGAC	rv Primer für <i>downstream</i> Region von <i>hoxE</i> (<i>Syn</i> 6803) (SacI)	27
ka75	<u>agttcg</u> aaaaagcgccGTGAGCAAGGGCGAGG	fw Primer für ' <i>strep-eyfp</i> (BstBI)	33
ka76	<u>atactag</u> TTATTACTTGTAtAGTCGTCC	rv Primer für <i>eyfp</i> (SpeI, kein BsrGI)	29
ka77	<u>tctaga</u> AATACAAGCAAGTTAGAAGTATTTTTTC	fw Primer für <i>upstream</i> Region von <i>nrsS</i> (<i>Syn</i> 6803) (XbaI)	34
ka78	<u>GCTAGCT</u> CAACAAAATTGTCC	rv Primer in <i>nrsR</i> (<i>Syn</i> 6803) (NheI)	21
ka79	<u>ATCGAT</u> GGTTGACCGATAAACACC	fw Primer in <i>nrsC</i> (<i>Syn</i> 6803) (ClaI)	24
ka80	<u>actagt</u> GATGCACTGAAAGCAGGGTG	rv Primer für <i>downstream</i> Region von <i>nrsD</i> (<i>Syn</i> 6803) (SpeI)	26
ka95	ACACCATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAA AAAGGCGCCAGCGGAGACATCAAGGC	fw Primer für <i>strep-hoxF</i> (<i>Ro</i> MR11) (NcoI)	61
ka96	<u>agcgatc</u> TTATCATTCCTCTTCCCCTCC	rv für <i>hoxU</i> (<i>Ro</i> MR11) (BamHI)	30
ka97	<u>acaccatgg</u> ctagctggagccacccgcagttcgaaaaagcgccAAACACT CCGAGAAGAACG	fw Primer für <i>strep-hoxY</i> (<i>Ro</i> MR11) (NcoI)	63
ka99	AACCGGATTGAAGTG	fw Primer in <i>hoxF</i> (<i>Ro</i> MR11)	15
ka100	CCCGGAGGTCTTGG	fw Primer in 5'-UTR von <i>hoxY</i> (<i>Ro</i> MR11)	14
ka101	TCATTGATCACGTGTCC	rv Primer in <i>hoxH</i> (<i>Ro</i> MR11)	17
ka102	<u>agcagatct</u> ATCACGAAATTGATGCTCCGGTGC	rv Primer für <i>hoxW</i> (<i>Ro</i> MR11) (BglII)	33
ka103	TCATTTGATCTCCTCC	fw Primer in <i>hoxU</i> (<i>Ro</i> MR11)	16
ka102 b	TTAAGCTTGTGGATTGGTGG	fw Primer, bindet <i>upstream</i> der Integrationsstelle von pDAK59 in <i>Syn</i> 6803	20
ka103 b	TATATACTGTCTGATGGGGG	rv Primer, bindet <i>downstream</i> der Integrationsstelle von pDAK59 in <i>Syn</i> 6803	20
ka104	TCACTCCCACCGCTTCGG	fw Primer in <i>hoxH</i> (<i>Syn</i> 6803)	18
ka105	GCCATCTGCTCTGTGCGG	rv Primer in <i>hoxH</i> (<i>Syn</i> 6803)	18

Tab. S2 Mutageneseprimer. Unterschiede zur *Wildtyp*-Sequenz sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. sinnveränderte Codons sind hervorgehoben. Neu entstehende Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5' -> 3')	Beschreibung (Restriktionsschnittstelle)	nt
ka12	GCGTCG gAgGAgcTc CCTGCGACGCCGATGGATCC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _H12E	35
ka13	CGCAGG gAgcTCcTc CGACGCAATCTCGTCTTTGTGG	(SacI)	37
ka14	GCTGGAG gAaTTc CGCGAGAACTGCG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _H99E	26
ka15	CGCG gAaTtTc CTCCAGCGTTTCGATGTTC	(EcoRI)	29
ka16	CCATTC gAa CCCCGATATCCCGAGGA	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _H153E	24
ka17	ATCGGG ttTcGAAT TGGAACGACGGCCTTG	(BstBI)	28
ka18	GGT CTag GCGGCTGCTGGGGGTGTAC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C39G	26
ka19	CAGCC GcTt AGACCGATCGTGGCCAC	(BfaI)	26
ka20	GAGCGC gtTG CGATCGGCTTCGTGG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C79V	25
ka21	GATCGC Aac GCGCTCCGGAATTCG	(kein AfeI/Eco47III)	24
ka22	GAGAAC CaGCG AtATCCTGATTTTCGG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C104S	25
ka23	CAGG ATaTCG CtGTTCTCGCGAAAGTG	(EcoRV)	27
ka24	GAAAGAT gta CTGGCAGAGGCTTATGTC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C131V	28
ka25	GCCAG Gtac ATCTTTCAGCTCGAAGACG	(RsaI)	27
ka26	ACCCT gtg CATGAGGTGGTCAAGATGG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C166V	27
ka27	CTCAT Gcac AGGGTAGACCTTGGTGG	(kein BspHI)	26
ka58	GGTCTG gcCGG CTGCTGGGGGTGTACC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C39A	27
ka59	CAGCAGCC Ggc CAGACCGATCGTGGCCACC	(NaeI)	30
ka60	CGGTCTG TcCG GaTGCTGGGGGTGTACCTTG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C39S	31
ka61	CCCAGCA tCCGgA CAGACCGATCGTGGCC	(BspEI/AccIII)	29
ka62	GTGCGGC gGCT GGGGGTGTAC aTT GTCTTTC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C41G	32
ka63	tGT ACACCC CCAGG CcGCCGCACAGACCGATCG	(BsrGI)	32
ka64	GTGCG GaTc TGGGGGTGTACCTTGTC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C41S	28
ka65	CCCAG GgAt CCGCACAGACCGATCGTGGC	(BamHI)	28
ka81	GGGG gGTAC CTTGTCTTTCTCGACATGG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C44G	29
ka82	GGACAAG GTACc CCCCCAGCAGCCGCAC	(KpnI)	28
ka83	GGGG aGTAC tTTGTCTTTCTCGACATGG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C44S	29
ka84	GGACAA aGTAC tCCCCCAGCAGCCGCACAG	(ScaI)	30
ka85	GGGCG gGCG CcGTGTGGGGCGGTGTG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C113G	26
ka86	CCACAC gGCG CcCGCCCCGACCGAAATCAGG	(KasI)	31
ka87	GGGCG aGCG CtGTGTGGGGCGGTGTG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C113S	26
ka88	CAC aGCG CtCGCCCCGACCGAAATCAGG	(AfeI/Eco47III)	28
ka89	GGGT gG CCCCCGATGGAGATGC	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C179G	24
ka90	GGGG Cc ACCCGGAATGAAATAATCC	(ApaI)	26
ka91	CCGG GaTcc CCCCCGATGGAGATG	Mutageneseprimer für <i>hoxY</i> _C179S	25
ka92	GggAt CCCCGGAATGAAATAATCCATCTTGACC	(BamHI)	32

Tab. S3 Übersicht aller BioBrick-Konstrukte für die heterologe Expression des SH-Operons

Name	RUCKGRAD	RS	UPSTREAM	RS	PROMOTOR	RS	GENE	RS	TERMINATOR	RS	DOWNSTREAM	RS
pDAK28	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxF [*]	Ndel	BstBI			
pDAK29	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK30	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK31	LITMUS						hypA2B2 [*]	Ndel	AgeI			
pDAK32	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	hypA2B2F2CDEX	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK33	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel	XbaI	rrsC		SpeI-NotI-PstI
pDAK34	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel		rrsC		SpeI-NotI-HindIII
pDAK35	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	hypA2B2F2CDEX	Ndel		rrsC		SpeI-NotI-HindIII
pDAK36	LITMUS			XbaI	P _{nrB}	Ndel	hypA2B2F2CDEX	Ndel		rrsC		SpeI-NotI-HindIII
pDAK37	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel				
pDAK38	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK39	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK40	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	hypA2B2F2CDEX	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII-XbaI			
pDAK41	LITMUS				MfeI		hypA					
pDAK42 o1	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel			Cm [®]	
pDAK42 o2	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel				
pDAK51	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel				
pDAK52	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel				
pDAK53	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel				
pDAK54	LITMUS			BstXI			addA::sacB					
pDAK55 o1	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI-P _{psbAII} -Ndel-hypA2B2F2CDEX	Ndel				
pDAK55 o2	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI-SpeI-P _{psbAII} -Ndel-hypA2B2F2CDEX _{anti}	Ndel				
pDAK56	LITMUS						addA::sacB					
pDAK57	LITMUS			BstXI			addA::sacB					
pDAK58	LITMUS			BstXI			addA::sacB					
pDAK59	LITMUS			BstXI			addA::sacB					
pDAK61	LITMUS			XbaI					Bba_B0015			SpeI-NotI-PstI
pDAK62	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-eyfp	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK63	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-eyfp	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK64	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-eyfp	Ndel			rrsC	SpeI-NotI-HindIII
pDAK65 o2 *	pLO3			XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-eyfp	Ndel			rrsC	
pDAK66	LITMUS			XbaI								
pDAK67	LITMUS			NheI								
pDAK68	LITMUS				P _{nrB}	Ndel	strepl [*]		NheI			
pDAK69	LITMUS			XbaI							rrsCD	SpeI
pDAK70	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel	Bba_B0015		rrsCD	SpeI-NotI-PstI
pDAK71 o1 *	pLO3			XbaI	P _{nrB}	Ndel	strepl-hoxFUYHWHI	Ndel	Bba_B0015		rrsC	SpeI-NotI-PstI
pDAK72	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-eyfp	Ndel	Bba_B0015		rrsC	
pDAK75	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	rrsSR (P _{nrB})	Ndel	hypA2B2F2CDEX	Ndel			Km [®]	
pDAK76	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	rrsSR (P _{nrB})	Ndel	strepl-eyfp	Ndel				
pDAK81	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel	SpeI-NotI-SbfI-HindIII			
pDAK82	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-eyfp	Ndel	Bba_B0015			SpeI-NotI-HindIII
pDAK83	LITMUS			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	hypA2B2F2CDEX	Ndel	Bba_B0015			SpeI-NotI-HindIII
pDAK84	LITMUS			AvrII-BsrGI-HindIII-NotI-XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-eyfp	Ndel	Bba_B0015			SpeI-NotI-HindIII
pDAK85 o1	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel			Cm [®]	
pDAK85 o2	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-hoxFUYHWhypA2B2F2CDEX	Ndel				
pDAK86 o1	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-eyfp	Ndel				
pDAK86 o2	pVZ321			XbaI	P _{psbAII} (6803)	Ndel	strepl-eyfp	Ndel			Cm [®]	

* o1: Tet[®] downstream der Expressionskassette (und in sense), o2: Tet[®] upstream der Expressionskassette (und in antisense)

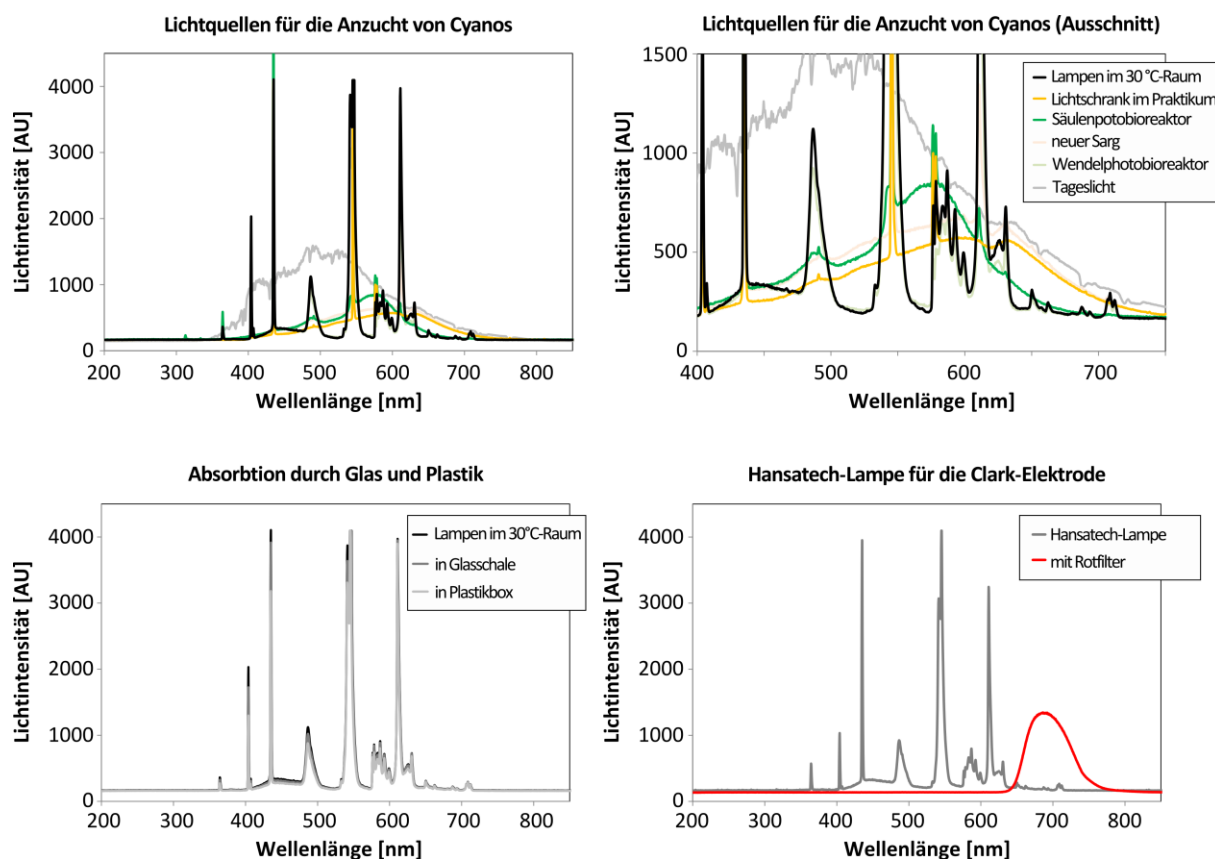


Abb. S1 Spektren der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lichtquellen. Aufgezeichnet mit einem USB-Spektrometer (FU Berlin); AU (arbitrary units) = willkürliche Einheiten

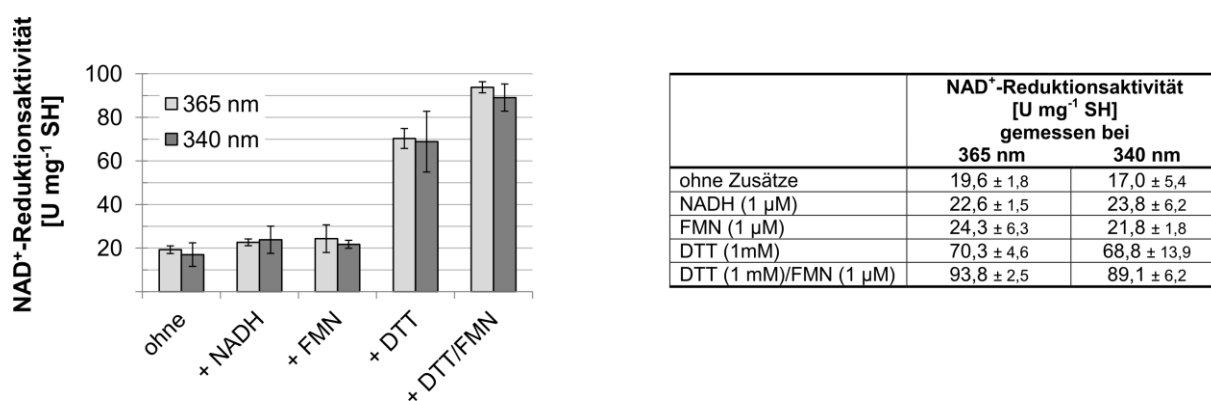


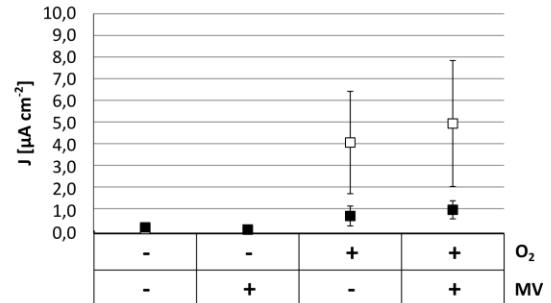
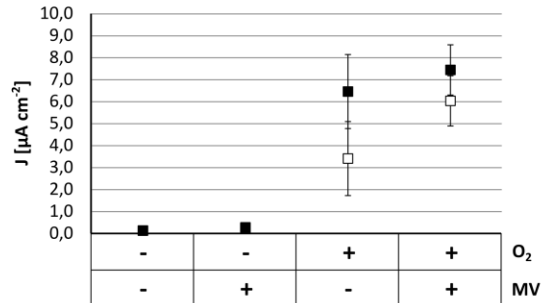
Abb. S2 Photometrische Bestimmung von NAD⁺-Reduktionsaktivitäten. Die H₂-abhängige NADH-Produktion wurde bei der standardmäßig verwendeten Wellenlänge 365 nm sowie beim Absorptionsmaximum von NADH 340 nm verfolgt. Die Aktivitäten wurden unter Verwendung der entsprechenden Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{NADH},365} = 3,43 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ NADH cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{NADH},340} = 6,13 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ NADH cm}^{-1}$ berechnet. Ein Unit (1 U) entspricht der Produktion von 1 µmol NADH min⁻¹.

Messreihe 2012

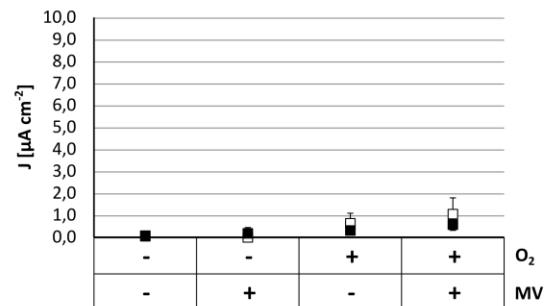
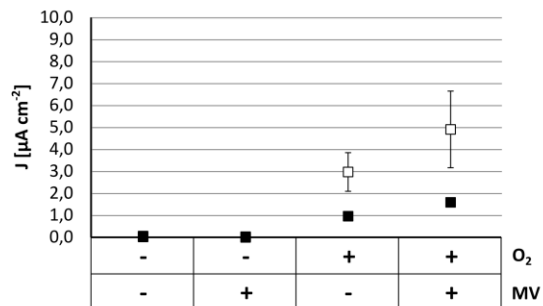
Immobilisierung: pH 9.0
Aktivitätsmessung: pH 4.0

Immobilisierung: pH 7.0
Aktivitätsmessung: pH 7.0

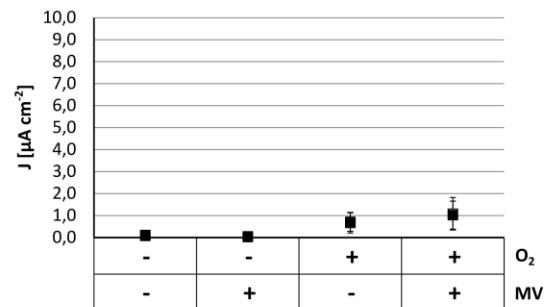
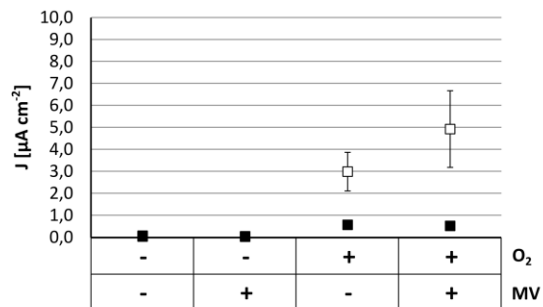
(1) PSI Δ PsaD + SH^{PsaD} (■) PSI Δ PsaD (□)



(2) PSI Δ PsaE + SH^{PsaE} (■) PSI Δ PsaE (□)



(3) PSI Δ PsaE + SH^{WT} (■) PSI Δ PsaE (□)



(4) PSI WT + SH^{PetF} (■) PSI WT (□)

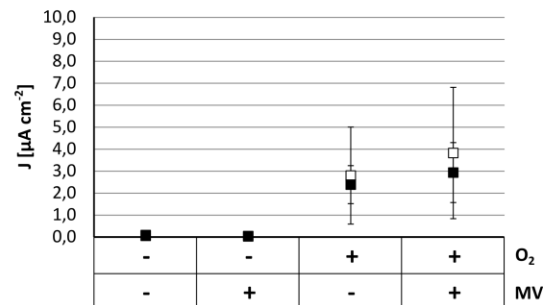
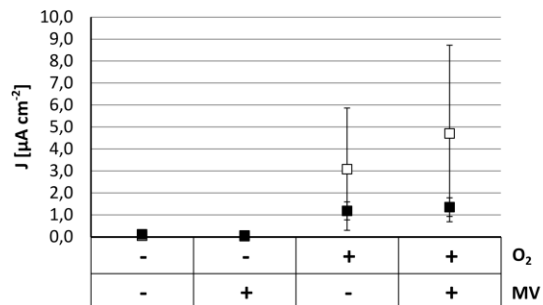


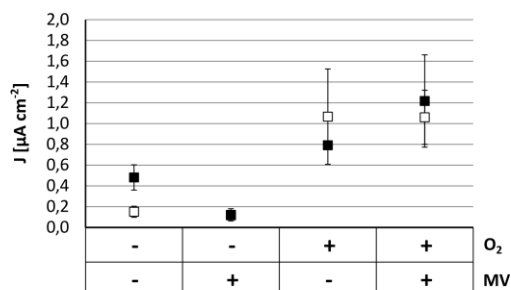
Abb. S3 Elektrochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe an einer mit Osmium-Polymeren gekoppelten Elektrode – Messreihe 2012. (Legende siehe nächste Seite)

Messreihe 2013

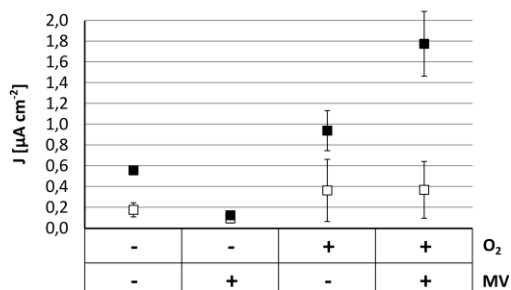
Immobilisierung: pH 9.0

Aktivitätsmessung: pH 4.0

(1) PSI Δ PsaD + SH^{PsaD} (■) PSI Δ PsaD (□)



(2) PSI Δ PsaE + SH^{PsaE} (■) PSI Δ PsaE (□)



(3) PSI Δ PsaE + SH^{WT} (■) PSI Δ PsaE (□)

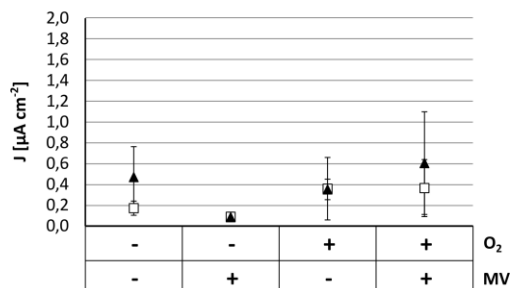


Abb. S4 Elektrochemische Charakterisierung der SH-PSI-Hybridkomplexe an einer mit Osmium-Polymeren gekoppelten Elektrode – Messreihe 2013. PSI-Komplexe (2,5 μ g PSI/Elektrode) bzw. SH-PSI - Gemische (2,5 μ g PSI und 7,5 μ g SH/Elektrode) wurden in einem mit Osmium funktionalisierten Polymer auf Goldelektroden (3,14 mm²) immobilisiert. Die lichtabhängigen Stromdichten wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von O₂ (95 % (v/v) N₂/ 5 % (v/v) H₂) vs. Luft (21 % (v/v) O₂) und Methylviologen (MV, 3 mM) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Varianz von je zwei präparierten Elektroden. Bitte andere Skaleneinteilung im vgl. zu Abb. S3 beachten.

Legende Abb. S3 PSI-Komplexe (2,5 μ g PSI/Elektrode) bzw. SH-PSI-Hybride (2,5 μ g PSI und 7,5 μ g SH/ Elektrode) wurden in einem mit Osmium funktionalisierten Polymer auf Glaskohlenstoff- (7,068 mm²) oder Goldelektroden (3,14 mm²) immobilisiert. Die lichtabhängigen Stromdichten wurde in Abwesenheit und Anwesenheit von O₂ (95 % (v/v) N₂/ 5 % (v/v) H₂) bzw. Luft (21 % (v/v) O₂) und Methylviologen (MV, 3 mM) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von je drei präparierten Elektroden.

Tab. S4 Übersicht zur Charakterisierung der SH-Mutantenstämme und der aus diesen gereinigten SH-Varianten

	C/A ¹	Lithoautotrophes Wachstum		H ₂ → NAD ⁺ (% der Wildtyp-Aktivität)				MV → H ₂ (% der Wildtyp-Aktivität)	Spektroskopische Daten
		10 % O ₂	35 % O ₂	CTAB-behandelte Zellen	löslicher Extrakt	gereinigter Proteinkomplex	gereinigter Proteinkomplex		
SH ^{C41G}	C	∅	-	0	-	1	2	(x)	
SH ^{C41S}	C	∅	-	0	-	8	10	x	
SH ^{C44G}	C	∅	-	0	-	-	-	-	
SH ^{C44S}	C	∅	-	0	-	0	0	-	
SH ^{C113G}	C	∅	-	0	-	-	-	-	
SH ^{C113S}	C	∅	-	0	-	1	0	-	
SH ^{C179G}	C	∅	-	0	-	-	-	-	
SH ^{C179S}	C	∅	-	0	-	1	0	-	
SH ^{C39G}	A	++++	+	49	51	32	18	x	
SH ^{C39A}	A	++++	++	38	-	49	29	-	
SH ^{C39S}	A	++++	+++	63	-	83	-	x	
SH ^{C79V}	A	++++	+++	-	75	89	-	-	
SH ^{C104S}	A	++++	+	-	34	71	-	-	
SH ^{C131V}	A	++++	++++	-	109	134	-	-	
SH ^{C166V}	A	++++	+++	-	51	103	-	-	
SH ^{H12E}	A	++++	++	-	44	85	-	-	
SH ^{H99E}	A	++++	+++	-	85	95	-	-	
SH ^{H153E}	A	++++	+	-	39	79	-	-	
SH ^{W42S}	A	∅	-	0	-	0	0	x	

¹ C: Austausch eines hochkonservierten Cysteinesrestes, A: Austausch einer *R. eutropha*-Typ-spezifischen Aminosäure

∅ nicht nachweisbar

- nicht bestimmt

x spektroskopische Daten liegen vor

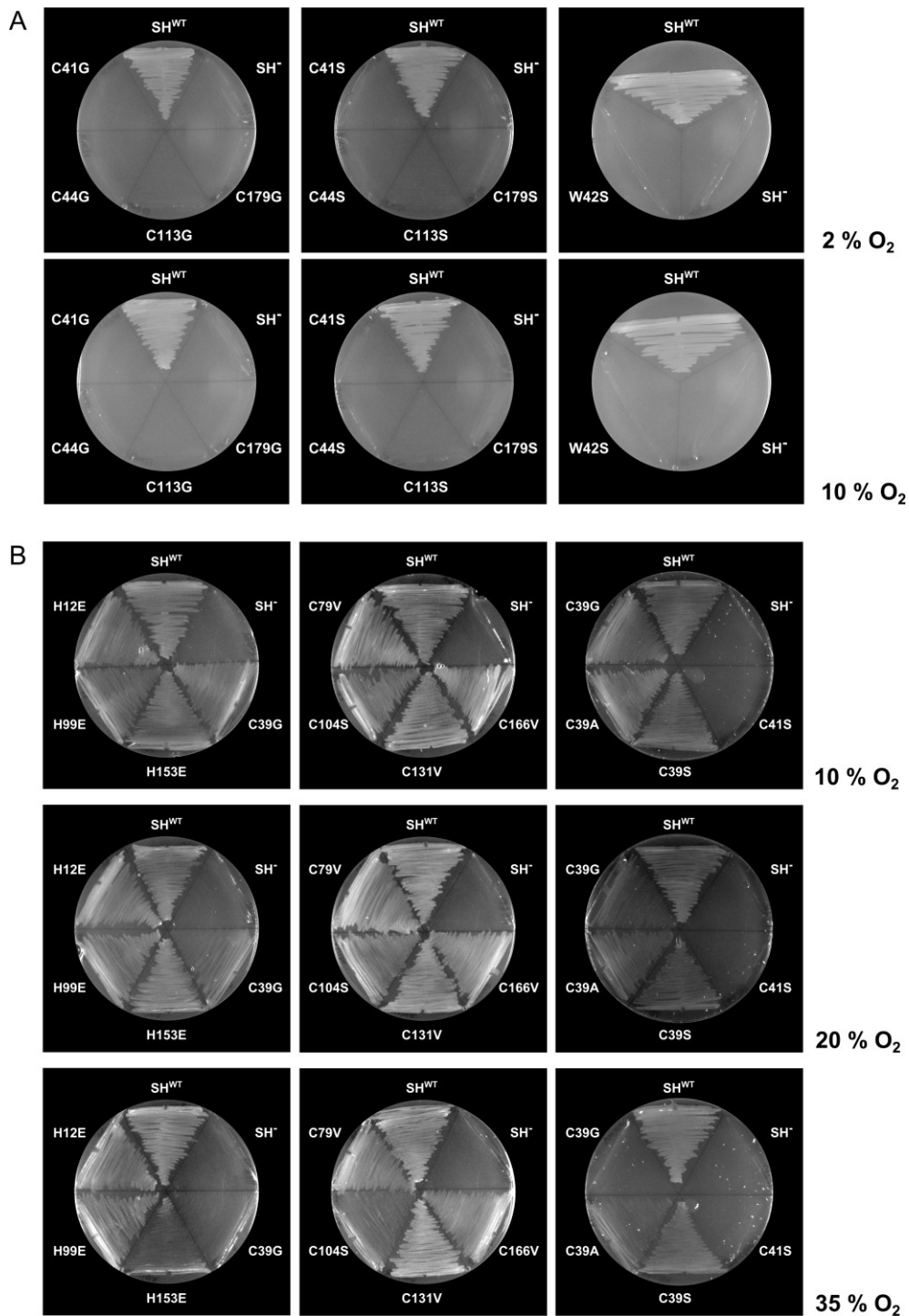


Abb.S5 SH-basiertes lithoautotrophes Wachstum der Mutantenstämme. (A) Mutantenstämme mit Aminosäureaustauschen der konservierten Cysteine bzw. des Tryptophans W42 (B) Mutantenstämme mit Aminosäureaustauschen der für areobe Pyridrinnukleotid-abhängige [NiFe]-Hydrogenasen spezifischen Histidine und Cysteine. Synchronisierte Zellen wurden auf Mineralagarplatten ohne organische C-Quelle ausgestrichen und unter einer Atmosphäre aus 10 % (v/v) CO₂, 3 % (v/v) H₂, x % (v/v) O₂ und (87-x) % (v/v) N₂ für 5 Tage inkubiert. Dargestellt sind beispielhafte Ergebnisse, der mindestens dreimal wiederholten Wachstumsexperimente. Eine qualitative Zusammenfassung aller Ergebnisse findet sich in Tab. 9.

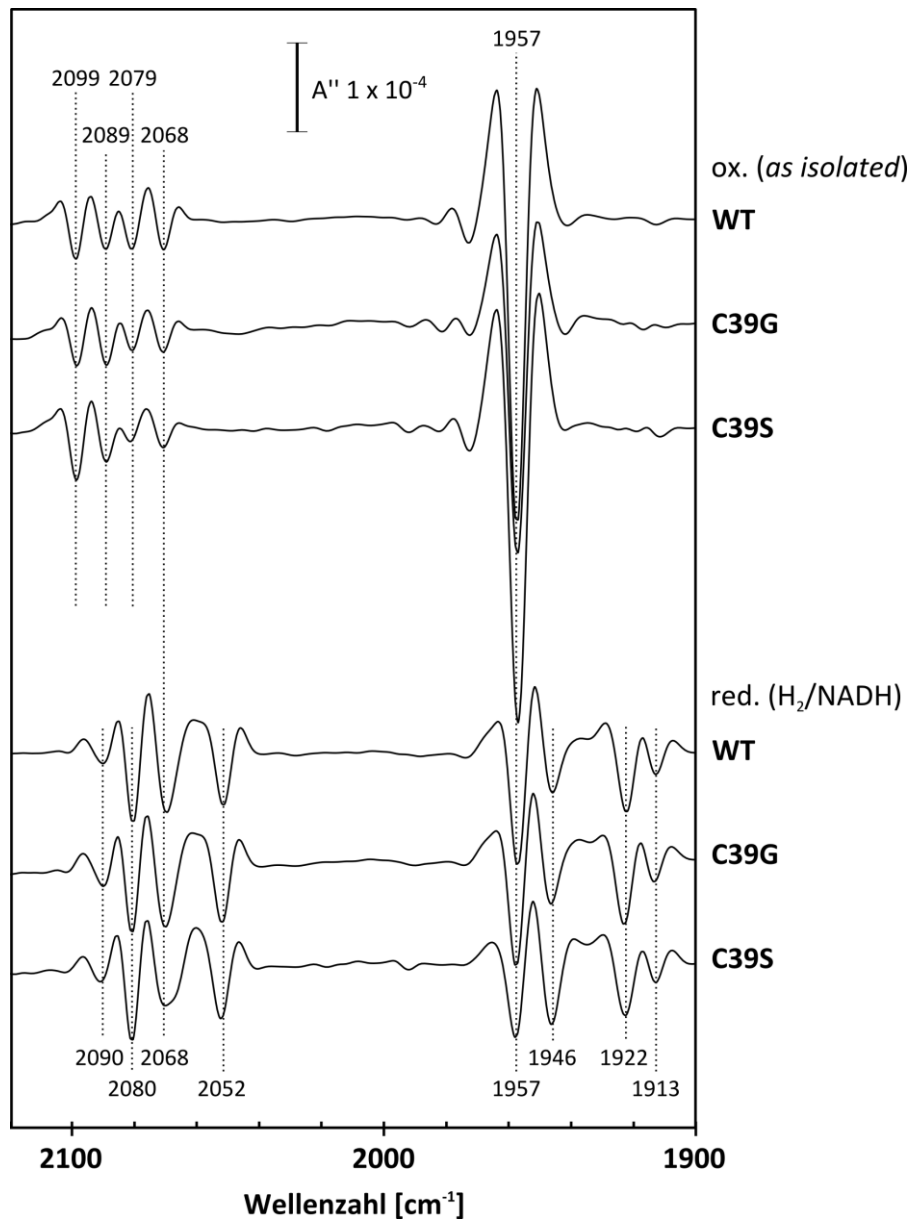
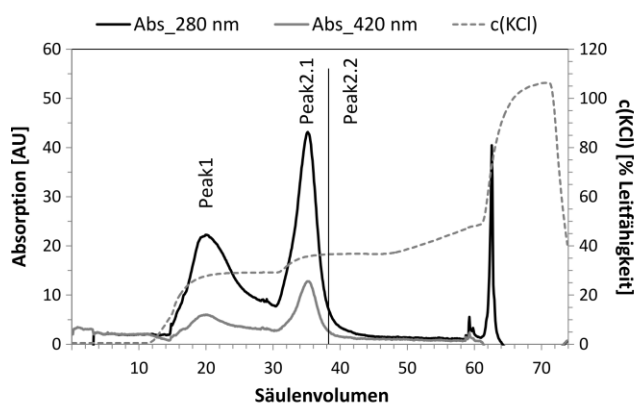


Abb. S6 FTIR-Spektren der SH^{WT}-, SH^{C39G}- und SH^{C39S}-Komplexe. Dargestellt sind die 2. Ableitungen der Spektren der luftoxidierten, unbehandelten (ox. (*as isolated*)) Proben sowie der mit NADH und H₂ reduzierten (red. H₂/NADH) Proben. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 5 mM NADH und 30-minütige Inkubation unter einer H₂-Atmosphäre.

Tab. S5 NAD⁺-Reduktionsaktivitäten verschiedener Präparationen des SH_{RoMR11}- und des SH_{ReH16}-Komplexes. Aktivitäten und Standardabweichung sind angegeben in $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$. Außer die Probe SH_{RoMR11} -3- wurden die SH-Komplexe während des Zellaufschlusses mit NAD⁺ behandelt.

	SH _{RoMR11} -1-	SH _{RoMR11} -2-	SH _{RoMR11} -3-	SH _{ReH16} -1-	SH _{ReH16} -2-
TrisHCl (50 mM, pH 8,0) mit 0,5 mM NiCl₂ und 5 mM MgSO₄					
ohne Zusätze	22,8 ± 2,9	12,0 ± 2,2	13,9 ± 0,4	12,9 ± 4,3	22,5 ± 7,8
1 μM FMN	17,2 ± 2,9	11,7 ± 1,1		12,2 ± 3,0	18,5 ± 2,3
1 μM FAD	20,1 ± 4,1	11,5 ± 0,5		9,8 ± 3,3	15,1 ± 5,4
1 mM TCEP		8,9 ± 1,7	12,5 ± 0,3		61,4 ± 3,7
10 mM KCl	22,1 ± 2,7	11,0 ± 1,1		7,3 ± 0,9	24,2 ± 4,0
10 mM NaCl	15,7 ± 0,8	7,5 ± 2,0		5,7 ± 1,6	16,5 ± 2,7
TrisHCl (50 mM, pH 8,0)					
ohne Zusätze	0,1 ± 0,1			16,5 ± 2,21	
1 μM FMN	0,0 ± 0,0			24,7 ± 7,9	
1 mM DTT	0,0 ± 0,0			52,4 ± 8,9	
1 μM FMN/ 1 mM DTT	0,1 ± 0,1			62,7 ± 6,9	
1 μM FAD/ 1 mM DTT				50,7 ± 5,0	

**Versuchsparameter**

Säule:	Mono Q 5/50 HR (AG Schneider)
Puffer:	A: 25 mM TrisHCl pH 9.0 @ 4 °C, temperiert auf 4 °C B: A mit 1 M KCl
Enzym:	SH(W42S)_ReH16 (~ 2 mg) in 100 μl Puffer A
Elutionsprofil:	I: 0 % Puffer B (5 SV) II: Gradient bis 24,5 % Puffer B (5 SV) III: 24,5 % Puffer B (15 SV) IV: 31,5 % Puffer B (15 SV) V: Gradient bis 45 % Puffer B (15 SV) VI: 100 % Puffer B (10 SV) VII: 0 % Puffer B (5 SV)
Durchflussrate:	1 ml min ⁻¹ (bei ~ 2,5-3,5 MPa)

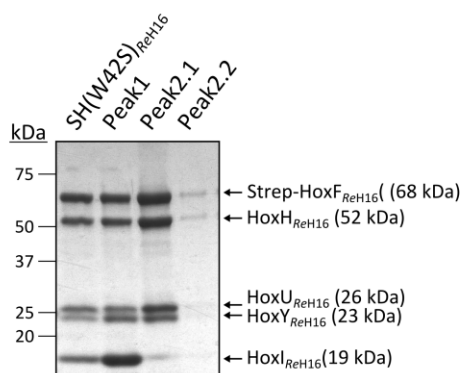
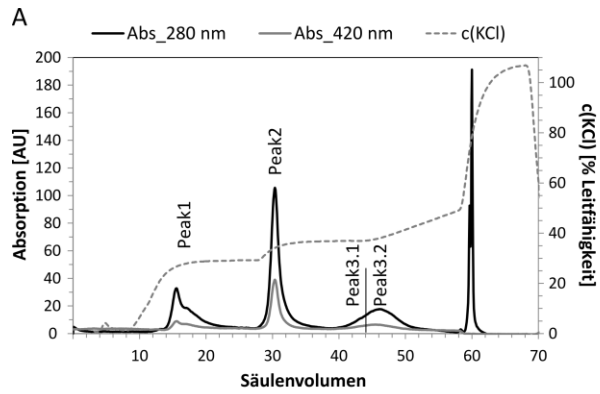
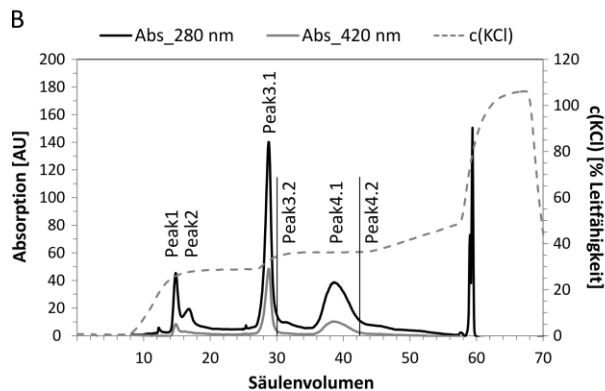
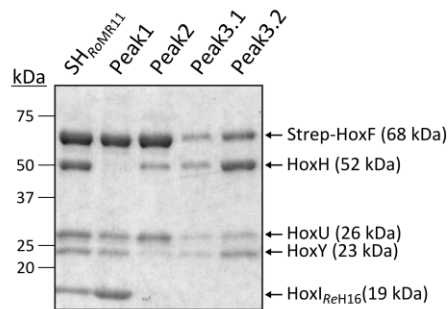


Abb. S7 Fraktionierung des SH_{ReH16}-Komplexes mittels Anionenaustausch-Chromatographie. *Legende siehe auch Abb. S8.*



Versuchsparameter

Säule:	Mono Q 5/50 HR (AG Schneider)
Puffer:	A: 25 mM TrisHCl pH 9.0 @4 °C, temperiert auf 4 °C B: A mit 1 M KCl
Enzym:	SH_RoMR11 (~ 2 mg Präp K) in 100 µl Puffer A
Elutionsprofil:	I: 0 % Puffer B (5 SV) II: Gradient bis 24,5 % Puffer B (5 SV) III: 24,5 % Puffer B (15 SV) IV: 31,5 % Puffer B (15 SV) V: Gradient bis 45 % Puffer B (15 SV) VI: 100 % Puffer B (10 SV) VII: 0 % Puffer B (5 SV)
Durchflussrate:	1 ml min ⁻¹ (bei ~ 2,5-3,5 MPa)



Versuchsparameter

Säule:	neue Mono Q 5/50 GL
Puffer:	A: 25 mM TrisHCl pH 9.1 @4 °C, temperiert auf 4 °C B: A mit 1 M KCl
Enzym:	SH_RoMR11 (~ 2 mg Präp K) in 100 µl Puffer A
Elutionsprofil:	I: 0 % Puffer B (5 SV) II: Gradient bis 24,5 % Puffer B (5 SV) III: 24,5 % Puffer B (15 SV) IV: 31,5 % Puffer B (15 SV) V: Gradient bis 45 % Puffer B (15 SV) VI: 100 % Puffer B (10 SV) VII: 0 % Puffer B (5 SV)
Durchflussrate:	1 ml min ⁻¹ (bei ~ 1,5-2 MPa)

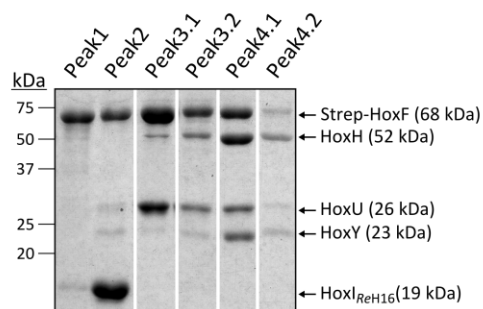


Abb. S8 Fraktionierung des SH_{RoMR11}-Komplexes mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Gezeigt sind die Chromatogramme sowie die jeweiligen Versuchsparameter der Versuche (A) und (B). Die Fraktionen der im Chromatogramm markierten Peaks wurden gepoolt und konzentriert. Proben wurden im SDS-PAGE (4-15 %) aufgetrennt und Proteine durch Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung sichtbar gemacht. AU: willkürliche Einheiten, SV: Säulenvolumen (1 ml)

Literaturverzeichnis

- Appel, J.; Phunpruch, S.; Steinmüller, K.; Schulz, R.** (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173 (5-6), 333–8.
- Armstrong, F. A.** (2004) Hydrogenases: active site puzzles and progress. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (Current Opinion in Chemical Biology) 8 (2), 133–40.
- Arslan, E.; Schulz, H.; Zufferey, R.; Künzler, P.; Thöny-Meyer, L.** (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (3), 744–7.
- Badura, A.; Guschin, D.; Kothe, T.; Kopczak, M. J.; Schuhmann, W.; Rögner, M.** (2011a) Photocurrent generation by photosystem I integrated in crosslinked redox hydrogels. *Energy Environ. Sci.* 4 (7), 2435.
- Badura, A.; Kothe, T.; Schuhmann, W.; Rögner, M.** (2011b) Wiring photosynthetic enzymes to electrodes. *Energy Environ. Sci.* 4 (9), 3263.
- Bergmeyer, H. U.** (1983) Redoxreactions. Weinheim: VCH Publishers (Vol. 1).
- Bernát, G.; Waschewski, N.; Rögner, M.** (2009) Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth. Res. (Photosynthesis Research)* 99 (3), 205–16.
- Bernhard, M.; Schwartz, E.; Rietdorf, J.; Friedrich, B.** (1996) The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J. Bacteriol.* 178 (15), 4522–9.
- Bernstein, J. R.; Bulter, T.; Liao, J. C.** (2008) Transfer of the high-GC cyclohexane carboxylate degradation pathway from *Rhodopseudomonas palustris* to *Escherichia coli* for production of biotin. *Metab. Eng.* 10 (3-4), 131–40.
- Berto, P.; D'Adamo, S.; Bergantino, E.; Vallese, F.; Giacometti, G. M.; Costantini, P.** (2011) The cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is able to express an active [FeFe]-hydrogenase without additional maturation proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405 (4), 678–83.
- Birnboim, H. C.; Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6), 1513–23.
- Böck, A.; King, P. W.; Blokesch, M.; Posewitz, M. C.** (2006) Maturation of hydrogenases. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 1–71.
- Bradley, J.** (2013). *Masterthesis*. University of Oxford, Oxford.
- Brecht, M.; van Gastel, M.; Buhrke, T.; Friedrich, B.; Lubitz, W.** (2003) Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H₂-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (43), 13075–83.
- Brettel, K.; Leibl, W.** (2001) Electron transfer in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507 (1-3), 100–14.
- Bryant, D. A.** (1994) The molecular biology of cyanobacteria. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers (Advances in photosynthesis, 1).
- Buhrke, T.** (2002) Der H₂-Sensor von *Ralstonia eutropha*. Struktur-Funktions-Beziehungen einer neuartigen [NiFe]-Hydrogenase. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Buhrke, T.; Lenz, O.; Krauss, N.; Friedrich, B.** (2005) Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J. Biol. Chem.* 280 (25), 23791–6.

- Burgdorf, T.; Lenz, O.; Buhrke, T.; van der Linden, E.; Jones, A. K.; Albracht, S. P. J.; Friedrich, B.** (2005a) [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10 (2-4), 181–96.
- Burgdorf, T.; van der Linden, E.; Bernhard, M.; Yin, Q. Y.; Back, J. W.; Hartog, A. F.; Muijsers, A. O.; Koster, C. G. de; Albracht, S. P. J.; Friedrich, B.** (2005b) The soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J. Bacteriol.* 187 (9), 3122–32.
- Bürstel, I.** (2013) Die pleiotrope Maturation der sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha*. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Chen, W. P.; Kuo, T. T.** (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21 (9), 2260.
- Clerico, E. M.; Ditty, J. L.; Golden, S. S.** (2007) Specialized techniques for site-directed mutagenesis in cyanobacteria. *Methods Mol. Biol.* 362, 155–71.
- Clowes, R. C.; Rowley, D.** (1954) Some observations on linkage effects in genetic recombination in *Escherichia coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.* 11 (2), 250–60.
- Constant, P.; Chowdhury, S. P.; Hesse, L.; Pratscher, J.; Conrad, R.** (2011) Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H(2)-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (17), 6027–35.
- Cournac, L.; Guedeney, G.; Peltier, G.; Vignais, P. M.** (2004) Sustained Photoevolution of Molecular Hydrogen in a Mutant of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Deficient in the Type I NADPH-Dehydrogenase Complex. *J. Bacteriol.* 186 (6), 1737–46.
- Cramm, R.** (2009) Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16 (1-2), 38–52.
- Dawson, R. M. C.** (1989) Data for biochemical research. 3. Aufl. Oxford: Clarendon Press (Oxford science publications).
- Délécouls, K.; Saint-Aguet, P.; Zaborosch, C.; Bergel, A.** (1999) Mechanism of the catalysis by *Alcaligenes eutrophus* H16 hydrogenase of direct electrochemical reduction of NAD⁺. *J. Electroanal. Chem. (Journal of Electroanalytical Chemistry)* 468 (2), 139–49.
- Dernedde, J.; Eitingner, T.; Patenge, N.; Friedrich, B.** (1996) hyp Gene Products in *Alcaligenes Eutrophus* are part of a Hydrogenase-Maturation System. *Eur. J. Biochem.* 235 (1-2), 351–8.
- Dismukes, G. C.; Carrieri, D.; Bennette, N.; Ananyev, G. M.; Posewitz, M. C.** (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 19 (3), 235–40.
- Ducat, D. C.; Sachdeva, G.; Silver, P. A.** (2011a) Rewiring hydrogenase-dependent redox circuits in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (10), 3941–6.
- Ducat, D. C.; Way, J. C.; Silver, P. A.** (2011b) Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* 29 (2), 95–103.
- Eckert, C.; Boehm, M.; Carrieri, D.; Yu, J.; Dubini, A.; Nixon, P. J.; Maness, P.-C.** (2012) Genetic Analysis of the Hox Hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Reveals Subunit Roles in Association, Assembly, Maturation, and Function. *J. Biol. Chem.* 287 (52), 43502–15.
- Elhai, J.; Vepritskiy, A.; Muro-Pastor, A. M.; Flores, E.; Wolk, C. P.** (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179 (6), 1998–2005.
- Elhai, J.; Wolk, C. P.** (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167, 747–54.

- Erkens, A.; Schneider, K.; Müller, A.** (1996) The NAD-linked soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16: detection and characterization of EPR signals deriving from nickel and flavin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 1996 (1), 99–110.
- Finkenwirth, F.; Neubauer, O.; Gunzenhäuser, J.; Schoknecht, J.; Scolari, S.; Stöckl, M.; Korte, T.; Herrmann, A.; Eiting, T.** (2010) Subunit composition of an energy-coupling-factor-type biotin transporter analysed in living bacteria. *Biochem. J.* 431 (3), 373–80.
- Forzi, L.; Sawers, R. G.** (2007) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals* 20 (3-4), 565–78.
- Friedrich, B.; Heine, E.; Finck, A.; Friedrich, C. G.** (1981) Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145 (3), 1144–9.
- Frielingsdorf, S.; Fritsch, J.; Schmidt, A.; Hammer, M.; Löwenstein, J.; Siebert, E.; Pelmeshnikov, V.; Jaenicke, T.; Kalms, J.; Rippers, Y.; Lendzian, F.; Zebger, I.; Teutloff, C.; Kaupp, M.; Bittl, R.; Hildebrandt, P.; Friedrich, B.; Lenz, O.; Scheerer, P.** (2014) Reversible [4Fe-3S] cluster morphing in an O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase. *Nat Chem Biol* 10 (5), 378–85.
- Fritsch, J.; Lenz, O.; Friedrich, B.** (2011a) The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* 193 (10), 2487–97.
- Fritsch, J.; Lenz, O.; Friedrich, B.** (2013) Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (2), 106–14.
- Fritsch, J.; Scheerer, P.; Frielingsdorf, S.; Kroschinsky, S.; Friedrich, B.; Lenz, O.; Spahn, C. M. T.** (2011b) The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature* 479 (7372), 249–52.
- Germer, F.; Zebger, I.; Saggu, M.; Lendzian, F.; Schulz, R.; Appel, J.** (2009) Overexpression, Isolation, and Spectroscopic Characterization of the Bidirectional [NiFe] Hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 284 (52), 36462–72.
- Goris, T.; Wait, A. F.; Saggu, M.; Fritsch, J.; Heidary, N.; Stein, M.; Zebger, I.; Lendzian, F.; Armstrong, F. A.; Friedrich, B.; Lenz, O.** (2011) A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* 7 (5), 310–8.
- Grunzel, M.** (2012) Einfluss aromatischer Aminosäuren auf die Bindung des Flavinmononukleotid-Kofaktors im Hydrogenasemodul der löslichen, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* H16. *Bachelorarbeit*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Grzeszik, C.** (1996) Molekularbiologische Untersuchungen an der löslichen Hydrogenase von *Rhodococcus opacus*. *Dissertation*. Georg-August-Universität, Göttingen.
- Grzeszik, C.; Lübbers, M.; Reh, M.; Schlegel, H. G.** (1997) Genes encoding the NAD-reducing hydrogenase of *Rhodococcus opacus* MR11. *Microbiology* 143 (Pt 4), 1271–86.
- Guerrero, F.; Carbonell, V.; Cossu, M.; Correddu, D.; Jones, P. R.; Neilan, B.** (2012) Ethylene Synthesis and Regulated Expression of Recombinant Protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* 7 (11), e50470.
- Gutekunst, K.; Chen, X.; Schreiber, K.; Kaspar, U.; Makam, S.; Appel, J.** (2014) The Bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Is Reduced by Flavodoxin and Ferredoxin and Is Essential under Mixotrophic, Nitrate-limiting Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 289 (4), 1930–7.
- Harris, R. L.; Barbieri, S.; Paraskevopoulos, K.; Murphy, L. M.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S.; Sawers, R. G.** (2010) Characterization of cycP Gene Expression in *Achromobacter xylosoxidans* NCIMB 11015 and High-Level Heterologous Synthesis of Cytochrome c ' in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2), 102–8.
- Hebbeln, P.** (2008) Untersuchungen zur Struktur und Funktion primär und sekundär aktiver Transporter für Übergangsmetallkationen. Ein neuartiger Mechanismus der Substrataufnahme in Prokaryoten. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.

- Hoffmann, D.; Gutekunst, K.; Klissenbauer, M.; Schulz-Friedrich, R.; Appel, J.** (2006) Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Additional homologues of hypA and hypB are not active in hydrogenase maturation. *FEBS J.* 273 (19), 4516–27.
- Horch, M.; Lauterbach, L.; Lenz, O.; Hildebrandt, P.; Zebger, I.** (2012) NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett.* 586 (5), 545–56.
- Horch, M.; Lauterbach, L.; Saggi, M.; Hildebrandt, P.; Lendzian, F.; Bittl, R.; Lenz, O.; Zebger, I.** (2010) Probing the active site of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49 (43), 8026–9.
- Hörnig, S.** (2011) Genetischer Transfer der H₂-Oxidation und CO₂-Fixierung in obligat heterotrophe Organismen. *Diplomarbeit.* Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg.
- Huang, H. H.; Camsund, D.; Lindblad, P.; Heidorn, T.** (2010) Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res.* 38 (8), 2577–93.
- Ihara, M.; Nishihara, H.; Yoon, K.-S.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Nakamoto, H.; Kojima, K.; Honma, D.; Kamachi, T.; Okura, I.** (2006) Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a [NiFe]-hydrogenase and the cyanobacterial photosystem I. *Photochem. Photobiol.* 82 (3), 676–82.
- Iwaki, T.; Haranoh, K.; Inoue, N.; Kojima, K.; Satoh, R.; Nishino, T.; Wada, S.; Ihara, H.; Tsuyama, S.; Kobayashi, H.; Wadano, A.** (2006) Expression of foreign type I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (EC 4.1.1.39) stimulates photosynthesis in cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 cells. *Photosynth. Res. (Photosynthesis Research)* 88 (3), 287–97.
- Iwuchukwu, I. J.; Vaughn, M.; Myers, N.; O'Neill, H.; Frymier, P.; Bruce, B. D.** (2010) Self-organized photosynthetic nanoparticle for cell-free hydrogen production. *Nat. Nanotechnol. (Nature nanotechnology)* 5 (1), 73–9.
- Keefe, R. G.; Axley, M. J.; Harabin, A. L.** (1995) Kinetic mechanism studies of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Biochem. Biophys.* 317 (2), 449–56.
- Kleihues, L.; Lenz, O.; Bernhard, M.; Buhrke, T.; Friedrich, B.** (2000) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J. Bacteriol.* 182 (10), 2716–24.
- Knight, T. F.** (2003) Idempotent Vector Design for Standard Assembly of BioBricks. *Tech. rep.* Online verfügbar unter <http://web.mit.edu/synbio/release/docs/biobricks.pdf>.
- Komar, A. A.** (2009) A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem. Sci.* 34 (1), 16–24.
- Kortlücke, C.; Friedrich, B.** (1992) Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 174 (19), 6290–3.
- Krassen, H.; Schwarze, A.; Friedrich, B.; Ataka, K.; Lenz, O.; Heberle, J.** (2009) Photosynthetic hydrogen production by a hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *ACS Nano* 3 (12), 4055–61.
- Krezel, A.; Bal, W.** (2004) A formula for correlating pK_a values determined in D₂O and H₂O. *J. Inorg. Biochem.* 98 (1), 161–6.
- Kruse, O.; Hankamer, B.** (2010) Microalgal hydrogen production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (3), 238–43.
- Kuchmina, E.; Wallner, T.; Kryazhov, S.; Zinchenko, V.; Wilde, A.** (2012) An expression system for regulated protein production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its application for construction of a conditional knockout of the ferroxidase enzyme. *J. Bacteriol.* 162 (1), 75–80.
- Kuhn, M.; Steinbüchel, A.; Schlegel, H. G.** (1984) Hydrogen evolution by strictly aerobic hydrogen bacteria under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 159 (2), 633–9.

- Kwon, J.-H.; Bernát, G.; Wagner, H.; Rögner, M.; Rexroth, S.** (2013). Reduced light-harvesting antenna: Consequences on cyanobacterial metabolism and photosynthetic productivity. *Algal Res.* (99), 205–16.
- Lacey, A. L. de; Fernandez, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R.** (2007) Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. *Chem. Rev.* 107 (10), 4304–30.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–5.
- Lagarde, D.; Beuf, L.; Vermaas, W.** (2000) Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1), 64–72.
- Lauterbach, L.** (2013) Die Analyse der Sauerstofftoleranz und biotechnologische Anwendung der NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Lauterbach, L.; Idris, Z.; Vincent, K. A.; Lenz, O.** (2011a) Catalytic properties of the isolated diaphorase fragment of the NAD-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE* 6 (10), e25939.
- Lauterbach, L.; Lenz, O.** (2013) Catalytic production of hydrogen peroxide and water by oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase during H₂ cycling in the presence of O₂. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (47), 17897–905.
- Lauterbach, L.; Lenz, O.; Vincent, K. A.** (2013) H₂ -driven cofactor regeneration with NAD(P)⁺-reducing hydrogenases. *FEBS J.* 280 (13), 3058–68.
- Lauterbach, L.; Liu, J.; Horch, M.; Hummel, P.; Schwarze, A.; Haumann, M.; Vincent, K. A.; Lenz, O.; Zebger, I.** (2011b) The Hydrogenase Subcomplex of the NAD⁺-Reducing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* - Insights into Catalysis and Redox Interconversions. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2011 (7), 1067–79.
- Lenz, O.; Friedrich, B.** (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (21), 12474–9.
- Lenz, O.; Gleiche, A.; Strack, A.; Friedrich, B.** (2005) Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Bacteriol.* 187 (18), 6590–5.
- Lenz, O.; Ludwig, M.; Schubert, T.; Bürstel, I.; Ganskow, S.; Goris, T.; Schwarze, A.; Friedrich, B.** (2010) H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Chem. Eur. J. of Chem. Phys.* 11 (6), 1107–19.
- Liebgott, P.-P.; Lacey, A. L. de; Burlat, B.; Cournac, L.; Richaud, P.; Brugna, M.; Fernandez, V. M.; Guigliarelli, B.; Rousset, M.; Léger, C.; Dementin, S.** (2011) Original Design of an Oxygen-Tolerant [NiFe] Hydrogenase: Major Effect of a Valine-to-Cysteine Mutation near the Active Site. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (4), 986–97.
- Liebgott, P.-P.; Leroux, F.; Burlat, B.; Dementin, S.; Baffert, C.; Lautier, T.; Fourmond, V.; Ceccaldi, P.; Cavazza, C.; Meynial-Salles, I.; Soucaille, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Rousset, M.; Léger, C.** (2009) Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* 6 (1), 63–70.
- Lindberg, P.; Park, S.; Melis, A.** (2010) Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab. Eng.* 12 (1), 70–9.
- Liu, X.; Curtiss, R.** (2009) Nickel-inducible lysis system in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (51), 21550–4.
- Liu, X.; Sheng, J.; Curtiss, R.** (2011) Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (17), 6899–904.
- Lubitz, W.; Reijerse, E.; van Gastel, M.** (2007) [NiFe] and [FeFe] Hydrogenases Studied by Advanced Magnetic Resonance Techniques. *Chem. Rev.* 107 (10), 4331–65.

- Lubner, C. E.; Applegate, A. M.; Knörzer, P.; Ganago, A.; Bryant, D. A.; Happe, T.; Golbeck, J. H.** (2011) Solar hydrogen-producing bionanodevice outperforms natural photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (52), 20988–91.
- Lubner, C. E.; Grimme, R.; Bryant, D. A.; Golbeck, J. H.** (2010a) Wiring photosystem I for direct solar hydrogen production. *Biochemistry* 49 (3), 404–14.
- Lubner, C. E.; Knörzer, P.; Silva, P. J. N.; Vincent, K. A.; Happe, T.; Bryant, D. A.; Golbeck, J. H.** (2010b) Wiring an [FeFe]-Hydrogenase with Photosystem I for Light-Induced Hydrogen Production. *Biochemistry* 49 (48), 10264–6.
- Lukey, M. J.; Roessler, M. M.; Parkin, A.; Evans, R. M.; Davies, R. A.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Sargent, F.; Armstrong, F. A.** (2011) Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenases: the individual and collective importance of supernumerary cysteines at the proximal Fe-S cluster. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (42), 16881–92.
- Makarova, K. S.; Wolf, Y. I.; Koonin, E. V.** (2013) Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* 41 (8), 4360–77.
- Maróti, J.; Farkas, A.; Nagy, I. K.; Maróti, G.; Kondorosi, E.; Rákhely, G.; Kovács, K. L.** (2010) A second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (15), 5113–23.
- Marraccini, P.; Bulteau, S.; Cassier-Chauvat, C.; Mermet-Bouvier, P.; Chauvat, F.** (1993) A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* 23 (4), 905–9.
- Massanz, C.; Schmidt, S.; Friedrich, B.** (1998) Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 180 (5), 1023–9.
- McIntosh, C. L.; Germer, F.; Schulz, R.; Appel, J.; Jones, A. K.** (2011) The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (29), 11308–19.
- Mitschke, J.; Georg, J.; Scholz, I.; Sharma, C. M.; Dienst, D.; Bantscheff, J.; Voss, B.; Steglich, C.; Wilde, A.; Vogel, J.; Hess, W. R.** (2011) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (5), 2124–9.
- Newie, J.** (2010) Einfluss der Aminosäure-Umgebung der Eisen-Schwefel-Cluster auf die O₂-Toleranz der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* H16. *Bachelorarbeit*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Niederholtmeyer, H.; Wolfstädter, B. T.; Savage, D. F.; Silver, P. A.; Way, J. C.** (2010) Engineering cyanobacteria to synthesize and export hydrophilic products. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (11), 3462–6.
- Ogata, H.; Hirota, S.; Nakahara, A.; Komori, H.; Shibata, N.; Kato, T.; Kano, K.; Higuchi, Y.** (2005) Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure* 13 (11), 1635–42.
- Pandelia, M.-E.; Ogata, H.; Lubitz, W.** (2010) Intermediates in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase: Functional Spectroscopy of the Active Site. *Chem. Eur. J. of Chem. Phys.* 11 (6), 1127–40.
- Peters, J. W.; Lanzilotta, W. N.; Lemon, B. J.; Seefeldt, L. C.** (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* 282 (5395), 1853–8.
- Pfennig, N.** (1974) *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.* 100 (1), 197–206.
- Pilak, O.; Mamat, B.; Vogt, S.; Hagemeier, C. H.; Thauer, R. K.; Shima, S.; Vornrhein, C.; Warkentin, E.; Ermler, U.** (2006) The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *J. Mol. Biol.* 358 (3), 798–809.

- Pinto, F.; van Elburg, K. A.; Pacheco, C. C.; Lopo, M.; Noirel, J.; Montagud, A.; Urchueguia, J. F.; Wright, P. C.; Tamagnini, P.** (2012) Construction of a chassis for hydrogen production: physiological and molecular characterization of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant lacking a functional bidirectional hydrogenase. *Microbiology* 158 (2), 448–64.
- Porthun, A.; Bernhard, M.; Friedrich, B.** (2002) Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* 177 (2), 159–66.
- Preissler, J.** (2013) Erweiterung des Substratspektrums der NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase aus *R. eutropha* H16 für die Kofaktorregeneration. *Diplomarbeit*. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Quiagen** (2003) The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. *Fifth Edition*. Online verfügbar unter <http://www.qiagen.com/Knowledge-and-Support/Resource-Center/>.
- Ratzka, J.** (2011) Charakterisierung und Stabilisierung der löslichen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 für den technischen Einsatz bei der reduktiven Cofaktorregenerierung. *Dissertation*. Berlin, Technische Universität Berlin, Berlin.
- Ratzka, J.; Lauterbach, L.; Lenz, O.; Ansorge-Schumacher, M. B.** (2011) Systematic evaluation of the dihydrogen-oxidising and NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 as a cofactor regeneration catalyst. *Biocatal. Biotransformation (Biocatalysis and Biotransformation)*, 1–7.
- Ratzka, J.; Lauterbach, L.; Lenz, O.; Ansorge-Schumacher, M. B.** (2012) Stabilisation of the NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 through modification with methoxy-poly(ethylene) glycol. *J. Mol. Catal. B: Enzym. (Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic)* 74 (3-4), 219–23.
- Reeve, H. A.; Lauterbach, L.; Ash, P. A.; Lenz, O.; Vincent, K. A.** (2012) A modular system for regeneration of NAD cofactors using graphite particles modified with hydrogenase and diaphorase moieties. *Chem. Commun. (Camb.)* 48 (10), 1589–91.
- Rögner, M.** (2013) Metabolic engineering of cyanobacteria for the production of hydrogen from water. *Biochem. Soc. Trans.* 41 (5), 1254–9.
- Sancar, A.** (2003) Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *Chem. Rev.* 103 (6), 2203–38.
- Schäfer, C.; Friedrich, B.; Lenz, O.** (2013) Characteristics of a novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Schiffels, J.; Pinkenburg, O.; Schelden, M.; Aboulmaga, E.-H. A. A.; Baumann, M. E. M.; Selmer, T.; Battista, J. R.** (2013) An Innovative Cloning Platform Enables Large-Scale Production and Maturation of an Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase from *Cupriavidus necator* in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8 (7), e68812.
- Schneider, K.; Cammack, R.; Schlegel, H. G.** (1984a) Content and localization of FMN, Fe-S clusters and nickel in the NAD-linked hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b. *Eur. J. Biochem.* 142 (1), 75–84.
- Schneider, K.; Cammack, R.; Schlegel, H. G.; Hall, D. O.** (1979) The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta* 578 (2), 445–61.
- Schneider, K.; Schlegel, H. G.** (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim. Biophys. Acta* 452 (1), 66–80.
- Schneider, K.; Schlegel, H. G.** (1978) Identification and quantitative determination of the flavin component of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84 (3), 564–71.
- Schneider, K.; Schlegel, H. G.** (1981) Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem. J.* 193 (1), 99–107.

- Schneider, K.; Schlegel, H. G.; Jochim, K.** (1984b) Effect of nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1 b. *Eur. J. Biochem.* 138 (3), 533–41.
- Schwartz, E.; Henne, A.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Friedrich, B.; Gottschalk, G.** (2003) Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H(2)-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J. Mol. Biol.* 332 (2), 369–83.
- Schwarze, A.** (2010) Light-driven H₂ production by connecting O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenases from *Ralstonia eutropha* H16 with the cyanobacterial photosystem I. *Dissertation*. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Schwarze, A.; Kopczak, M. J.; Rögner, M.; Lenz, O.** (2010) Requirements for construction of a functional hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (8), 2641–51.
- Senger, M.** (2013) Light-driven Hydrogen Production by a Photosystem-Hydrogenase Hybrid Complex. *Diplomarbeit*. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Shih, C.; Museth, A. K.; Abrahamsson, M.; Blanco-Rodriguez, A. M.; Di Bilio, A. J.; Sudhamsu, J.; Crane, B. R.; Ronayne, K. L.; Towrie, M.; Vlcek, A.; Richards, J. H.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.** (2008) Tryptophan-Accelerated Electron Flow Through Proteins. *Science* 320 (5884), 1760–2.
- Shima, S.; Lyon, E. J.; Sordel-Klippert, M.; Kauß, M.; Kahnt, J.; Thauer, R. K.; Steinbach, K.; Xie, X.; Verdier, L.; Griesinger, C.** (2004) The Cofactor of the Iron–Sulfur Cluster Free Hydrogenase Hmd: Structure of the Light-Inactivation Product. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (19), 2547–51.
- Shima, S.; Thauer, R. K.** (2007) A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem. Rec. (Chemical record (New York, N.Y.))* 7 (1), 37–46.
- Shomura, Y.; Yoon, K.-S.; Nishihara, H.; Higuchi, Y.** (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature* 479 (7372), 253–6.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G.** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol. (Molecular Systems Biology)* 7.
- Simon, R.; Priefer, U.; Pühler, A.** (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol. (Nature Biotechnology)* 1 (9), 784–91.
- Stratagene** (2004) Instruction Manual: QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit. Online verfügbar unter <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/200518.pdf>.
- Stripp, S. T.; Happe, T.** (2009) How algae produce hydrogen—news from the photosynthetic hydrogenase. *Dalton Trans.* (45), 9960.
- Sun, J.; Hopkins, R. C.; Jenney, F. E.; McTernan, P. M.; Adams, M. W. W.** (2010) Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. *PLoS ONE* 5 (5), e10526.
- Temme, K.; Zhao, D.; Voigt, C. A.** (2012) Refactoring the nitrogen fixation gene cluster from *Klebsiella oxytoca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (18), 7085–90.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Des Higgins, G.** (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics (Current protocols in bioinformatics)* 2, Unit 2.3.
- Tous, C.; Vega-Palas, M. A.; Vioque, A.** (2001) Conditional expression of RNase P in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 allows detection of precursor RNAs. Insight in the *in vivo* maturation pathway of transfer and other stable RNAs. *J. Biol. Chem.* 276 (31), 29059–66.
- Trautmann, D.; Voss, B.; Wilde, A.; Al-Babili, S.; Hess, W. R.** (2012) Microevolution in Cyanobacteria: Re-sequencing a Motile Substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 19 (6), 435–48.
- van der Linden, E.; Burgdorf, T.; Lacey, A. L. de; Buhrke, T.; Scholte, M.; Fernandez, V. M.; Friedrich, B.; Albracht, S. P. J.** (2006) An improved purification procedure for the soluble [NiFe]-

hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11 (2), 247–60.

van der Linden, E.; Faber, B. W.; Bleijlevens, B.; Burgdorf, T.; Bernhard, M.; Friedrich, B.; Albracht, S. P. J. (2004) Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Eur. J. Biochem.* 271 (4), 801–8.

Vignais, P. M.; Billoud, B. (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* 107 (10), 4206–72.

Vignais, P. M.; Billoud, B.; Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (4), 455–501.

Volbeda, A.; Charon, M. H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373 (6515), 580–7.

Volbeda, A.; Darnault, C.; Parkin, A.; Sargent, F.; Armstrong, F. A.; Fontecilla-Camps, J. C. (2013) Crystal structure of the O₂-tolerant membrane-bound hydrogenase 1 from *Escherichia coli* in complex with its cognate cytochrome b. *Structure* 21 (1), 184–90.

Wahlefeld, S. (2013) Vibrational spectroscopy of cofactors in hydride-transferring enzymes. *Masterthesis*. Universität Potsdam, Potsdam.

Wang, R.; Healey, F. P.; Myers, J. (1971) Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 48 (1), 108–10.

Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25 (9), 1189–91.

Wells, M. A.; Mercer, J.; Mott, R. A.; Pereira-Medrano, A. G.; Burja, A. M.; Radianingtyas, H.; Wright, P. C. (2011) Engineering a non-native hydrogen production pathway into *Escherichia coli* via a cyanobacterial [NiFe] hydrogenase. *Metab. Eng.* 13 (4), 445–53.

Weyman, P. D.; Vargas, W. A.; Tong, Y.; Yu, J.; Maness, P.-C.; Smith, H. O.; Xu, Q.; Rodriguez-Valera, F. (2011) Heterologous Expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe] Hydrogenases in *Synechococcus elongatus*. *PLoS ONE* 6 (5), e20126.

Wilde, E.; Schlegel, H. G. (1982) Oxygen tolerance of strictly aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48 (2), 131–43.

Wilson, C. M. (1983) Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Meth. Enzymol.* 91, 236–47.

Winkler, M.; Kuhlert, S.; Hippler, M.; Happe, T. (2009) Characterization of the Key Step for Light-driven Hydrogen Evolution in Green Algae. *J. Biol. Chem.* 284 (52), 36620–7.

Wolf, I.; Buhrke, T.; DERNEDDE, J.; Pohlmann, A.; Friedrich, B. (1998) Duplication of hyp genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Microbiol.* 170 (6), 451–9.

Xu, Y. (2010) *Synechococcus* sp. PCC 7002: A robust and versatile cyanobacterial platform for biofuels development. *Dissertation*. Pennsylvania State University, PennState, Pennsylvania, US.

Xu, Y.; Alvey, R. M.; Byrne, P. O.; Graham, J. E.; Shen, G.; Bryant, D. A. (2011) Expression of Genes in Cyanobacteria: Adaptation of Endogenous Plasmids as Platforms for High-Level Gene Expression in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Methods Mol. Biol.* 684, 273–93.

Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1), 103–19.

Zaborosch, C. (1989) Untersuchungen an der NAD-reduzierenden Hydrogenase von *Nocardia opaca* 1b. *Dissertation*. Georg-August-Universität, Göttingen.

Zaborosch, C.; Köstert, M.; Bill, E.; Schneider, K.; Schlegel, H. G.; Trautweint, A. X. (1995) EPR and Mössbauer spectroscopic studies on the tetrameric, NAD-linked hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b and its two dimers: 1. The $\beta\delta$ -dimer - a prototype of a simple hydrogenase. *Biometals* 8 (2), 149–62.

Zheng, L.; Baumann, U.; Reymond, J.-L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32 (14), e115.

Zhu, B.; Tabor, S.; Raytcheva, D. A.; Hernandez, A.; King, J. A.; Richardson, C. C. (2013) The RNA Polymerase of Marine Cyanophage Syn5. *J. Biol. Chem.* 288 (5), 3545–52.

Zhu, B.; Tabor, S.; Richardson, C. C. (2014) Syn5 RNA polymerase synthesizes precise run-off RNA products. *Nucleic Acids Research* 42 (5), e33.

Zinchenko, V.; Piven, I.; Melnik, V.; Shestakov, S. (1999) Vectors for the complementation analysis of the cyanobacterial mutants. *Russian J. Genetics* (35), 228–32.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich möchte ich danken für die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer sehr gut ausgestatteten und weit vernetzten Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich bedanke mich auch für die gewinnbringenden Anregungen, ermutigenden Worte und die konstruktive Kritik.

Dr. Oliver Lenz gilt mein besonderer Dank für die Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für die ständige Diskussionsbereitschaft, die häufig ansteckende Begeisterung für die Hydrogenase-Forschung und den motivierenden Optimismus bei der Planung neuer Ansätze.

Weiterhin danke ich Moritz Senger und Dr. Sven Stripp (AG Heberle, FU Berlin), Tim Kothe (AG Rögner, Universität Bochum), Dr. Martin Winkler (AG Happe, Universität Bochum), Stefan Wahlefeld, Marius Horch, Dr. Friedhelm Lenzian und Dr. Ingo Zebger (AG Hildebrandt, TU Berlin) sowie Holly Reeve (AG Vincent, University of Oxford) für die gute Zusammenarbeit in den Kooperationsprojekten.

Prof. Dr. Thomas Eitinger und Dr. Stefan Frielingsdorf danke ich für die vielen Anregungen und Diskussionen sowie für die Ausblicke über den Tellerrand der Hydrogenase-Forschung.

Dr. Alexander Schwarze, Dr. Tobias Goris, Dr. Johannes Fritsch, Dr. Stefanie Ganskow, Dr. Ingmar Bürstel und Dr. Lars Lauterbach möchte ich danken für die bereitwillige Weitergabe ihrer Kenntnisse und für das Vormachen, dass es doch irgendwie und irgendwann wird mit der Dissertation.

Bei Josta Hamann, Janna Schoknecht und Angelika Strack bedanke ich mich für die Offenlegung ihres Erfahrungsfundus, für das allgemeine Labormanagement sowie für tatkräftige Unterstützung bei einigen Experimenten.

Den Mitglieder der AG Lockau, besonders Marianne, Gisa, Thomas und Yvonne, sowie Dr. Marcus Ludwig (PennState University), Prof. Dr. Annegret Wilde (Universität Freiburg), Dr. Ulf Dühring (CyanoBiofuels) möchte ich danken für die Beratung rundum das Thema Cyanobakterien.

Dr. Romy Scholz sei gedankt für die *Peptid Fingerprint*-Analyse einiger Proben.

Caspar Schäfer, Franziska Kirsch, Olivia Neubauer, Steffen Lütte, Steffi Ganskow und Sven Hörnig gilt mein Dank für den Beistand in den Höhen und Tiefen der Doktorarbeit. Vielen Dank ihr habt dazu beigetragen, dass es rückblickend bestimmt eine schöne Zeit gewesen sein wird!

Auch allen jetzt noch nicht genannten Kollegen sei gedankt für die stets nette und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre in den Laboren der Mikrobiologie.

Einen lieben Dank möchte ich außerdem Sandra Dittmann für das Lektorat dieser Arbeit aussprechen.

Abschließend danke meiner Familie und meinen Freunden, ganz besonders meinen Eltern sowie Monique Lentz und Christian Brückner, die mich kontinuierlich unterstützt, ermutigt, angefeuert und motiviert haben. Vielen Dank dafür! Der letzte Dank gilt trotz allem Rainer Keller für den ausdauernden Beistand in den letzten Jahren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Katja Karstens

